

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
LUÍS FELIPE CAVALLI PESSA

INFECÇÕES PELOS VÍRUS DA FAMÍLIA *HERPESVIRIDAE* NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL

Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais em pacientes
imunocomprometidos e imunocompetentes

CURITIBA
2011

LUÍS FELIPE CAVALLI PESSA

INFECÇÕES PELOS VÍRUS DA FAMÍLIA *HERPESVIRIDAE* NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL

Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais em pacientes
imunocomprometidos e imunocompetentes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sônia Mara Raboni.
Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Monteiro de Almeida.

CURITIBA

2011

RESUMO

Os herpesvírus humanos podem estar relacionados a encefalites, meningites e outras doenças neurológicas. No Brasil, as infecções virais estão entre as principais causas de internamentos hospitalares. Este trabalho tem como objetivos padronizar e comparar as metodologias de diagnóstico dos vírus da família *Herpesviridae* por *nested* PCR e PCR seguida por digestão com enzimas de restrição; descrever características clínicas e epidemiológicas de pacientes com encefalites, meningoencefalites e mielites causadas por vírus da família *Herpesviridae*, diagnosticados pela metodologia da PCR no laboratório de virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e comparar as características clínicas e laboratoriais dos diferentes grupos de pacientes (imunocomprometidos e imunocompetentes; com encefalites e meningoencefalites). As amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) foram obtidas de pacientes com suspeita de meningites e meningoencefalites, de 2005 a 2008. Os vírus da família *Herpesviridae* estudados foram: herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2), varicela zoster vírus (VZV), citomegalovírus (CMV), epstein-barr vírus (EBV) e herpesvírus humano 6 (HHV-6). Dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos a partir de prontuários médicos. As amostras foram submetidas a análises bioquímicas e citológicas. A metodologia que apresentou maior positividade foi a de *nested* PCR (19%). Um total de 46 amostras pertencentes a 45 pacientes foram positivas para um ou mais vírus. Prontuários médicos de 42 pacientes foram revisados. Os pacientes foram divididos em dois grupos: Grupo I, imunocompetentes 40,00% (18/45), e Grupo II, imunocomprometidos 47,00% (21/45), e também classificados em pacientes com encefalites, 57,50% (23/40), e meningoencefalites, 40,00% (16/40). No grupo I, a média de idade foi de 25,00 ± 21,60 anos, mediana de 19,00 anos (variação interquartil 25-75 de 8,50 a 42,00 anos), sendo 38,80% do sexo masculino. HHV-6 foi identificado em 33,00%, EBV 28,00%, HSV 11,00%, VZV 11,00%, enterovírus/EBV 11,00% e CMV 5,50% das amostras do grupo I. No grupo II, a média de idade foi de 35,10 ± 15,00 anos e mediana de 35,00 anos (variação interquartil 25-75 de 29,50 a 32,50 anos), sendo 66,66% do sexo masculino. EBV foi identificado em 36,00%, HSV em 32,00%, CMV em 18,20%, HHV-6 em 4,50%, HHV-6/CMV em 4,50% e CMV/HSV em 4,50% das amostras do grupo II. Em quatro amostras de ambos os grupos (9%, 4/46), foi identificado mais de um vírus no mesmo material. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com infecção neurológica por herpesvírus. O EBV foi o mais frequente em amostras de LCR no grupo dos imunocomprometidos (36,00%), enquanto no grupo dos imunocompetentes, o HHV-6 (33,00%) foi o patógeno mais comumente encontrado.

Palavras-chave: biologia molecular diagnóstica, encefalites virais, herpesvírus, meningoencefalites.

ABSTRACT

Human herpesviruses are strictly related to encephalitis, meningoencephalitis and other neurologic diseases. Nowadays, in Brazil, virus infections are among the main causes of hospital internalization. The objective of this study was to standardize the the *nested* PCR and PCR followed by restriction enzyme digestion diagnostic methods for the detection of the *Herpesviridae* family virus members. To describe clinical and epidemiologic features from patients with encephalitis, meningoencephalitis and myelitis caused by the *Herpesviridae* family viruses diagnosed at the virology laboratory from Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Brazil (HC-UFPR), by PCR analysis. Also to compare the clinical and laboratory features from the different group of patients (immunocompromised and imunocompetent; with encephalitis and meningoencefalites). The cerebrospinal fluid (CSF) samples were collected from patients with suspicion of viral encephalitis or meningoencephalitis from 2005 to 2008. The *Herpesviridae* virus tested were: herpes simplex virus type 1 (HSV-1), herpes simplex virus type 2 (HSV-2), varicella zoster virus (VZV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) and human herpesvirus 6 (HHV-6). Clinical and epidemiological data were obtained from medical records. The CSF samples were submitted to biochemical and cytological analysis. The *nested* PCR method presented a higher positivity (19%). During the study, 46 samples from 45 patients were positive for one or more virus. Medical records from 42 patients were revised. The patients were gruped as imunocompetent (group 1, 40,00%; 18/45) and imunocompromised (group 2, 47,00%; 21/45) and were also grouped according to the diagnostic as encephalitis (57,50%; 23/40) and meningoencephalitis (40,00%; 16/40). In group 1 the mean age was $25,00 \pm 21,60$ years old, median 19,00 years old (interquartile range 25-75, 8,50-42,00 years old) with 38,80% male patients. HHV-6 was diagnosed in 33,00%, EBV in 28,00%, HSV in 11,00%, VZV in 11,00%, enterovirus/EBV in 11,00%, CMV in 5,50% samples on group 1. On group 2 the mean age was $35,10 \pm 15,00$ years old and median was 35,00 years old (interquartile range 25-75, 29,50-32,50), with 66,66% male patients. EBV was diagnosed in 36,00%, HSV in 32,00%, CMV 18,20%, HHV-6 in 4,50%, HHV-6/CMV in 4,50% and CMV/HSV in 4,50% samples from group 2. In four samples from both groups (9%; 4/46) more than one virus were detected on the same CSF sample. There were no statistically significant difference between the epidemiological, clinical and laboratory data of patients with neurological infection by herpesvirus. HHV-6 was the most frequent virus diagnosed in imunocompetent patients (33,00%) while EBV was the most frequent virus detected in imunocompromised patients (36,00%).

Key words: herpesvírus, meningoencephalitis, molecular biologic diagnostics, viral encephalitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	RECEPTORES DA SUPERFÍCIE CELULAR E LIGANTES VIRAIS QUE PARTICIPAM NA ENTRADA DO HSV	18
FIGURA 2	REPRESENTAÇÃO DA AMOSTRAGEM DO ESTUDO	75
FIGURA 3	TAMANHO DOS PRODUTOS OBTIDOS APÓS PCR PARA PAN HERPES. AMOSTRAS TESTADAS, CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO	78
FIGURA 4	GEL DE AGAROSE APÓS CLIVAGEM DO PRODUTO DE PCR DA AMOSTRA POSITIVA PARA HHV-6 TIPO A	78
FIGURA 5	NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA VÍRUS DA FAMÍLIA <i>HERPESVIRIDAE</i> POR <i>NESTED</i> PCR CORRELACIONADAS COM A DATA DE INÍCIO DOS SINTOMAS	85
FIGURA 6	DISTRIBUIÇÃO DOS HERPESVÍRUS IDENTIFICADOS NAS 46 AMOSTRAS POSITIVAS PARA HERPESVÍRUS	87
FIGURA 7	DISTRIBUIÇÃO DOS HERPESVÍRUS ENCONTRADOS POR FAIXA ETÁRIA	88
FIGURA 8	PLUVIOSIDADE E NÚMERO DE AMOSTRAS DE LCR POSITIVAS PARA HERPESVIRUS ENTRE 2005 E 2008 NA CIDADE DE CURITIBA-PR	89
FIGURA 9	TEMPERATURA ATMOSFÉRICA E NÚMERO DE AMOSTRAS DE LCR POSITIVAS PARA HERPESVIRUS ENTRE 2005 E 2008 NA CIDADE DE CURITIBA-PR	90
FIGURA 10	NÚMERO DE CASOS EM QUE FOI ENCONTRADO DNA PARA HERPESVIRUS EM PACIENTES IMUNOCOMPETENTES (GRUPO 1) E IMUNOCOMPROMETIDOS (GRUPO 2)	92
FIGURA 11	VÍRUS DETECTADOS EM AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES CO-INFECTADOS COM HIV	97
FIGURA 12	LOCALIZAÇÃO DA INFECÇÃO NEUROLÓGICA POR VÍRUS ENCONTRADO	99
FIGURA 13	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE ÁCIDO LÁTICO ENTRE AMOSTRAS POSITIVAS PARA EBV, HSV, HHV-6 E CMV	103

FIGURA 14	COMPARAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL NO LCR DE PACIENTES DO GRUPO I (IMUNOCOMPETENTES) E GRUPO II (IMUNOCOMPROMETIDOS) DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS	105
FIGURA 15	COMPARAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO NO LCR ENTRE PACIENTES DO GRUPO I (IMUNOCOMPETENTES) E GRUPO II (IMUNOCOMPROMETIDOS) DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS	106
FIGURA 16	COMPARAÇÃO DOS VALORES DE PROTEÍNA TOTAL (mg/dL) ENCONTRADOS NO LCR DE PACIENTES DO GRUPO II HIV POSITIVOS, GRUPO II HIV NEGATIVOS E GRUPO I DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS	109
FIGURA 17	COMPARAÇÃO DOS VALORES DE ÁCIDO LÁTICO (mmol/L) ENCONTRADOS NO LCR DE PACIENTES DO GRUPO II HIV POSITIVOS, GRUPO II HIV NEGATIVOS E GRUPO I DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS	109
FIGURA 18	COMPARAÇÃO DE LEUCÓCITOS DO LCR DE PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS	111
FIGURA 19	COMPARAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NO LCR DE PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.....	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ANÁLISE DE CONTINGÊNCIA ENTRE AS 37 AMOSTRAS ANALISADAS CONCOMITANTEMENTE PELA METODOLOGIA DE PCR SEGUIDA POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E <i>NESTED</i> PCR.....	84
TABELA 2	CAUSAS DE IMUNOCOMPROMETIMENTO POR VÍRUS DA FAMÍLIA <i>HERPESVIRIDAE</i> DIAGNOSTICADAS	91
TABELA 3	DADOS DEMOGRÁFICOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS DOIS GRUPOS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS	93
TABELA 4	SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR HERPESVIRUS EM SNC.	94
TABELA 5	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES HIV POSITIVOS COM INFECÇÃO POR HERPESVÍRUS	96
TABELA 6	HERPESVÍRUS DIAGNOSTICADOS EM PACIENTES DO GRUPO II COM DOENÇAS DE BASE E COINFECÇÕES.....	98
TABELA 7	DADOS DEMOGRÁFICOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES COM HERPESVÍRUS IDENTIFICADO NO LCR	100
TABELA 8	SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES POR HERPESVÍRUS.	101
TABELA 9	DADOS BIOQUÍMICOS E CELULARES DAS AMOSTRAS DE LCR POR VÍRUS IDENTIFICADOS	102
TABELA 10	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUANTITATIVAS EM PACIENTES COM LCR COM COINFECÇÃO POR HERPESVÍRUS E SEM COINFECÇÃO POR HERPESVÍRUS	104
TABELA 11	LCR, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUANTITATIVAS EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS .	105
TABELA 12	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES ALTERADAS NO LCR DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS .	106

TABELA 13	LCR, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUANTITATIVAS EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS HIV POSITIVOS, IMUNOCOMPROMETIDOS HIV NEGATIVOS E IMUNOCOMPETENTES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.	108
TABELA 14	LCR, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUANTITATIVAS EM PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS	110
TABELA 15	LCR, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUALITATIVAS ALTERADAS EM PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS	112

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CMV	Citomegalovírus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleosídeos
DTT	Ditiotreitol
EBER	Transcrito de EBV não codificador de proteína
EBV	Epstein-barr vírus
EEG	Eletroencefalografia
ELTM	Epilepsia do lobo temporal mesial
EUA	Estados Unidos da América
GAG	Glicosaminoglicana
gB	Glicoproteína B
gC	Glicoproteína C
gD	Glicoproteína D
gH	Glicoproteína H
gL	Glicoproteína L
HAART	Tratamento antirretroviral altamente ativo
HC-UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HHV	Herpesvírus humano
HHV-6	Herpesvírus humano 6
HHV-7	Herpesvírus humano 7
HHV-8	Herpesvírus humano 8
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPP	Hospital Pequeno Príncipe
HSV-1	Herpes simplex vírus tipo 1
HSV-2	Herpes simplex vírus tipo 2
HVEM	Mediadores de entrada dos herpesvírus
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus

Ig G	Imunoglobulina G
Ig M	Imunoglobulina M
Kb	Quilo base
LAT	Transcrito associado à latência
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MI	Mononucleose infecciosa
NPH	Neuralgia pós-herpética
ORF	Fase aberta de leitura
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRV	<i>Pseudorabies virus</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNM	Ressonância magnética
SK	Sarcoma de Kaposi
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TAC	Tomografia axial computadorizada
TMO	Transplante de medula óssea
TNF	Fator de necrose tumoral
UI	Região única longa
Us	Região única curta
VZV	Varicela zoster vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 FAMÍLIA <i>HERPESVIRIDAE</i>	15
2.1.1 Classificação	15
2.1.2 Características biológicas dos vírus da família <i>Herpesviridae</i> de interesse humano	16
2.1.2.1 Características comuns a todos os vírus da família <i>Herpesviridae</i> de interesse humano	16
2.1.2.2 HSV-1 e HSV-2	19
2.1.2.3 VZV	21
2.1.2.4 EBV	22
2.1.2.5 CMV	23
2.1.2.6 HHV-6	24
2.1.2.7 HHV-7	25
2.1.2.8 HHV-8	26
2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES NEUROLÓGICAS POR HERPESVÍRUS	27
2.2.1 HSV-1 e HSV-2	28
2.2.2 VZV	30
2.2.3 EBV	31
2.2.4 CMV	32
2.2.5 HHV-6	33
2.2.6 HHV-7	34
2.2.7 HHV-8	35
2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS INFECÇÕES NEUROLÓGICAS POR HERPESVÍRUS	36
2.3.1 HSV-1 e HSV-2	36
2.3.2 VZV	38
2.3.3 EBV	39
2.3.4 CMV	41
2.3.5 HHV-6	42
2.3.6 HHV-7 e HHV-8	43
2.4 NEUROPATOLOGIA	44

2.4.1 HSV-1 e HSV-2	44
2.4.2 VZV.....	46
2.4.3 EBV	47
2.4.4 CMV.....	48
2.4.5 HHV-6.....	49
2.4.6 HHV-7	50
2.4.7 HHV-8.....	51
2.5 LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO	54
2.6 DIAGNÓSTICO DOS HERPESVÍRUS NO SNC	57
2.6.1 Diagnósticos por métodos de biologia molecular	59
2.6.1.1 Limitações das metodologias moleculares aplicadas ao LCR	67
3 JUSTIFICATIVA.....	70
4 OBJETIVOS	72
4. 1 OBJETIVO GERAL.....	72
4. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
5 MATERIAL E MÉTODOS	73
5.1 CASUÍSTICA.....	73
5.1.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	73
5.1.2 Grupo de estudo.....	74
5.1.3 Classificação de acordo com características imunológicas do paciente.....	74
5.1.4 Classificação em encefalite, meningoencefalite e mielite	74
5.2 MÉTODOS	75
5.2.1 Extração do DNA.....	76
5.2.2 Amplificação por PCR e identificação do produto por restrição enzimática	76
5.2.3 <i>Nested</i> PCR – 1° PCR	79
5.2.3.1 <i>Nested</i> PCR – 2° PCR	81
5.2.4 Comparações entre as técnicas de biologia molecular para pesquisa de herpevírus humanos no LCR.....	81
5.2.5 Sequenciamento.....	82
5.2.6 Características demográficas, clínicas e laboratoriais	82
5.2.7 Análises citológica e bioquímica do LCR	82
5.2.7.1 Análise citológica do LCR.....	82
5.2.7.2 Análise bioquímica do LCR	83
5.2.8 Procedimentos estatísticos.....	83

6 RESULTADOS	84
6.1 COMPARAÇÕES ENTRE AS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA PESQUISA DE HERPEVÍRUS HUMANOS NO LCR	84
6.2 POSITIVIDADE DA PCR RELACIONADA AO NÚMERO DE HEMÁCIAS E TEMPO DE COLETA DE LCR APÓS INÍCIO DOS SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS	84
6.3 SEQUENCIAMENTO DE AMOSTRA POSITIVA	85
6.4 DISTRIBUIÇÃO DOS VÍRUS DA FAMÍLIA <i>HERPESVIRIDAE</i> ENCONTRADOS	86
6.5 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	87
6.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS GRUPOS DE PACIENTES IMUNOCOMPETENTES E IMUNOCOMPROMETIDOS	91
6.6.1 Pacientes coinfectados com HIV	95
6.6.2 Pacientes com outros fatores de imunossupressão	97
6.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS GRUPOS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES	98
6.8 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS LCRS POSITIVOS PARA DNA DE HERPESVÍRUS	101
6.9 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS LCRS DOS PACIENTES IMUNOCOMPETENTES (GRUPO I) E IMUNOCOMPROMETIDOS (GRUPO II)	104
6.10 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS LCRS DE PACIENTES COINFECTADOS COM HIV	107
6.11 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS LCRS NOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ENCEFALITES E MENINGITES	110
7 DISCUSSÃO	113
8 CONCLUSÃO	128
REFERÊNCIAS	129
APÊNDICES	154
ANEXO	180

1 INTRODUÇÃO

Os vírus da família *Herpesviridae* estão associados a graves doenças neurológicas em humanos, que infectam tanto o sistema nervoso periférico (SNP) como o sistema nervoso central (SNC) (GILDEN *et al.*, 2007).

As infecções por herpesvírus no SNC se manifestam em diferentes síndromes clínicas, que diferem em incidência e apresentação entre indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; GILDEN, 2001a). Algumas infecções dos herpesvírus no SNC, como as causadas pelo citomegalovírus (CMV), epstein-barr (EBV) e varicela rooster (VZV), ocorrem principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Os herpesvírus também podem mostrar diferentes características clínicas, radiográficas e patológicas quando infectam o SNC de crianças (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; GILDEN, 2001a).

A meningite aguda é a síndrome infecciosa mais comum do SNC, definida como uma inflamação das meninges. Os sintomas clínicos são febre, sinais meningoradiculares, alteração de nível de consciência e cefaleia. A encefalite inclui sinais clínicos de envolvimento do parênquima encefálico, febre e alterações da consciência, que podem ser acompanhadas de sinais neurológicos focais (NOWAK; BOEHMER; FUCHS, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007; SOLOMON; HART; BEECHING, 2007).

Um estudo realizado entre 1967 e 1991, sobre a etiologia da encefalite, demonstrou que essa parece mudar com o tempo e a idade do paciente, sendo importante se estabelecer um padrão etiológico, o qual auxilia no diagnóstico, que é um pré-requisito para uma terapia bem-sucedida (RANTALAIHO *et al.*, 2001). As possibilidades de que alguns herpesvírus possam desempenhar um papel causal em diferentes síndromes do SNC torna imperativo aumentar os esforços para melhorar os testes diagnósticos, que possibilitem estudos sobre possíveis associações das doenças (KOMAROFF; ABLASHI; JACOBSON, 2008).

A introdução de metodologias de amplificação dos ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permite que se conheçam os distintos patógenos, sua patogênese e distribuição no SNC dos pacientes infectados (PUCHHAMMER-STÖCKL *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1999; BUSTOS; ATHERTON, 2002). Devido à aplicação das técnicas de PCR no líquido cefalorraquidiano (LCR) em grandes séries de pacientes, a frequência de muitas das síndromes mediadas

pelos herpesvírus só estão sendo devidamente avaliadas nas últimas décadas (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; GILDEN, 2001a).

O acesso a testes diagnósticos de PCR no LCR é difundido em muitos países, entretanto, com frequência, esses ensaios são desenvolvidos com metodologias caseiras e sem validação clínica. Embora muitos sejam padronizados por meio de sua aplicação em painéis de proficiência de produções independentes, a compreensão da interpretação clínica dos resultados da PCR ainda são incompletos. Clínicos muitas vezes permanecem com dúvidas quanto à importância dos resultados positivos e negativos (DAVIES *et al.*, 2005). Em países em desenvolvimento, poucos dados são relatados sobre a prevalência de infecções virais através da pesquisa de DNA viral pela metodologia da PCR no SNC (ROJANAWIWAT *et al.*, 2005). Por serem vírus capazes de manter processos de infecção latente, os quais podem ser reativados frente à imunossupressão, estudos necessitam ser realizados para melhor avaliar os resultados da PCR em pacientes imunocomprometidos (CHESKY *et al.*, 2000).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA *HERPESVIRIDAE*

2.1.1 Classificação

Em 2008, a família matriz *Herpesviridae* foi dividida pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) em três famílias, as quais foram incorporadas na nova ordem *Herpesvirales* (DAVISON *et al.*, 2009). As novas famílias são *Alloherpesviridae*, *Malacoherpesviridae* e *Herpesviridae* revisada. Essa última contém os vírus dos mamíferos e está subdividida em três famílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae* (ROIZMAN *et al.*, 1981; DAVISON *et al.*, 2009).

A inclusão dos vírus na família *Herpesviridae* baseia-se na arquitetura do vírion (ROIZMANN *et al.*, 1992) e a classificação em três subfamílias decorre da evidência de que, apesar de muitas propriedades compartilhadas, os herpesvírus também variam bastante em suas propriedades biológicas. Aproximadamente 130 herpesvírus diferentes foram identificados até o momento. Entre esses, há oito herpesvírus humanos (HHVs) descritos. A subfamília *Alphaherpesvirinae* contém os vírus herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1 ou HHV-1 e HSV-2 ou HHV-2) e varicela zoster (VZV ou HHV-3). A subfamília *Betaherpesvirinae* contém citomegalovírus (CMV ou HHV-5), herpes vírus humano tipo 6 (HHV-6) e o herpesvírus humano 7 (HHV-7). A *Gammapherpesvirinae* contém o herpes vírus humano 8 (HHV-8) e o vírus epstein-barr (EBV ou HHV-4) (ROIZMAN *et al.*, 1981; GILDEN *et al.*, 2007).

Os herpesvírus incluídos na subfamília *Alphaherpesvirinae* devem exibir, não exclusivamente, uma variável gama de hospedeiros, ciclo reprodutivo relativamente curto, rápida propagação em cultura, destruição eficiente das células infectadas e capacidade de estabelecer infecção latente nos gânglios sensoriais (ROIZMANN *et al.*, 1992).

As características dos membros da subfamília *Betaherpesvirinae* são uma gama de hospedeiros restrita, um longo ciclo reprodutivo e lenta propagação de célula a célula em cultura celular. As células infectadas frequentemente se

expandem (citomegalia) e culturas portadoras são prontamente estabelecidas. O vírus pode ser mantido na forma latente em células linforreticulares e possivelmente em glândulas secretoras, rins e outros tecidos (ROIZMANN *et al.*, 1992).

Os hospedeiros dos membros da subfamília *Gammaherpesvirinae* são, geralmente, limitados à família ou ordem a que o hospedeiro natural pertence. *In vitro*, todos os membros se replicam em células linfoblastoides e alguns também causam infecções líticas em alguns tipos de células epitelioides e fibroblásticas. Os vírus desse grupo tendem a ser específicos para linfócitos T ou B, mas pode haver exceções. Nos linfócitos, a infecção ocorre frequentemente em estágio lítico ou pré-lítico, mas, em geral, sem a produção de progênie infecciosa. Vírus latentes são, com frequência, demonstrados em tecido linfoide (ROIZMANN *et al.*, 1992).

2.1.2 Características biológicas dos vírus da família *Herpesviridae* de interesse humano

2.1.2.1 Características comuns a todos os vírus da família *Herpesviridae* de interesse humano

Os herpesvírus apresentam um vírion com um diâmetro de 150nm e com uma morfologia comum a todos. O DNA fita dupla é circundado por um capsídeo icosadeltaédrico contendo 162 capsômeros (SCHLEISS, 2009; MURRAY, 2000). Esse capsídeo está inserido em um envoltório ou envelope. O espaço entre o envoltório e o capsídeo é denominado tegumento e contém proteínas e enzimas virais que auxiliam no início da replicação (MURRAY, 2000).

Os diferentes herpesvírus codificam entre 70 e 200 genes. O material genético é formado por uma dupla fita linear de DNA que difere no tamanho, de aproximadamente 120 a 250 kb, e na orientação gênica. A composição das bases C+G varia de 31% a 75% e sequências repetidas diretas ou invertidas enquadram regiões únicas do material genético (região única longa [UL] e região única curta [Us]), permitindo a circularização e a recombinação no interior do genoma para formar isômeros. Essa circularização ocorre assim que o material genético adentra no núcleo do hospedeiro (MURRAY, 2000; ROIZMAN, 1991).

O vírion protege o genoma viral de condições adversas no meio extracelular e permite a invasão celular. Isso ocorre para que o genoma possa ser liberado no núcleo celular para a expressão de seus genes. A membrana externa, ou envelope do vírion, que circunda o tegumento é composta de lipídios, diversas proteínas virais e glicoproteínas que são responsáveis pela infectividade. Acredita-se que o contato inicial do HSV com uma célula ocorre pela ligação do vírion à cadeia glicosaminoglicana (GAG) dos peptídeoglicanos da superfície celular. Heparan sulfato, um dos diversos tipos de GAG, é considerado um receptor de ligação oposto a um receptor de entrada (SPEAR, 2004).

Segundo Spear (2004) duas das glicoproteínas virais, designadas gB e gC, são capazes de se ligar ao heparan sulfato. Embora essa ligação aumente significativamente a eficiência da infecção do HSV, ela não é absolutamente essencial, pelo menos para a infecção de células de cultivo. As interações de gB e gC do HSV com o heparan sulfato da superfície celular também não são suficientes para a entrada do vírus. Seguindo a ligação dos vírus à superfície celular, a entrada na célula requer que o gD viral se ligue a qualquer um dos vários receptores celulares (figura 1). A ligação de gD a um desses receptores dispara a fusão do envelope viral com a membrana celular e, portanto, a entrada do nucleocapsídeo viral e tegumento no citoplasma da célula. Essa fusão envelope-membrana requer a ação de outras glicoproteínas do envelope viral (gB e um heterodímero de gH-gL) além do gD e do receptor gD.

Os receptores de entrada pertencem a três classes. Eles incluem mediadores de entrada dos herpesvírus (HVEM), um membro da família de receptor de fator de necrose tumoral (TNF), nectina-1 e nectina-2, membros da superfamília das imunoglobulinas e sítios específicos em heparan sulfato gerados por certas 3-O-sulfotransferases. HSV-1 e HSV-2 diferem um pouco em preferências por receptores. Enquanto HVEM e nectina-1 são excelentes receptores de entrada para ambos os sorotipos, a nectina-2 é praticamente inativa para a entrada do HSV-1, mas tem atividade de entrada fraca para o HSV-2 (SPEAR, 2004).

As glicoproteínas gB, gH e gL são estruturalmente conservadas entre todos os herpesvírus e, provavelmente, possuem papéis essenciais na entrada viral. Glicoproteínas gC e gD, por outro lado, são conservadas entre a maioria dos *alpha*herpesvírus neurotrópicos, mas não possuem homologias estruturais reconhecíveis nos membros das duas outras subfamílias (SPEAR, 2004).

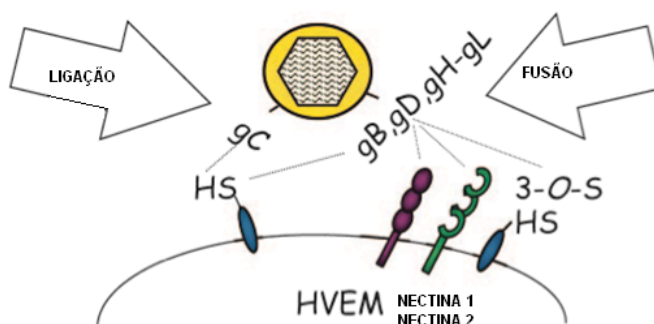


FIGURA 1 – RECEPTORES DA SUPERFÍCIE CELULAR E LIGANTES VIRAIS QUE PARTICIPAM NA ENTRADA DO HSV.
FONTE: adaptado de Spear (2004).

A coexistência por milhares de anos obrigou o hospedeiro a desenvolver uma resposta imune antiviral ampla. Por sua vez, os vírus se tornaram adaptados ao desafio de enfrentar o sistema imune do hospedeiro. Assim, na maioria das situações, um equilíbrio é alcançado para o controle das infecções dos herpesvírus pelo hospedeiro, enquanto a falha em erradicar completamente o vírus resulta em infecções que persistem pela vida (GRIFFIN; VERWEIJ; WIERTZ, 2010). Condições patológicas, além das infecções primárias, podem surgir na reativação viral após um período de latência, que podem ser decorrentes do potencial oncogênico inerente de certos herpesvírus (GRIFFIN; VERWEIJ; WIERTZ, 2010).

Os herpesvírus são capazes de alterar o meio celular para ajustá-lo a suas necessidades. Essas alterações incluem o desligamento ou a estimulação da síntese de macromoléculas da célula hospedeira, induzindo ou inibindo a replicação do DNA ou imortalizando a célula. Na célula, o vírus bloqueia a indução da morte celular programada e a ativação da via do interferon (por exemplo, pela ativação da proteína quinase R, que leva ao silenciamento das sínteses proteicas), atrasando a eliminação das células infectadas o bastante para permitir a replicação viral e a colonização do hospedeiro, tornando-se, assim, viável para infectar outro indivíduo

não imune. No organismo, a resposta é altamente variável e depende, em parte, da célula na qual o vírus se replica (ROIZMAN, 1991).

2.1.2.2 HSV-1 e HSV-2

Wadsworth, Jacob e Roizman (1975) demonstraram que o DNA de HSV-1 consiste em duas regiões desiguais, cada uma delimitada por sequências redundantes invertidas. A região L representa 70% do comprimento de contorno do DNA e separa a região terminal esquerda a_1b de sua invertida repetida $b'a'_1$, cada uma das quais compreendendo 6% do DNA. A região S representa 9,4% do DNA e separa a região terminal direita ca_s (4,3% do DNA) de sua invertida repetida $a'sc'$. As regiões dos dois terminais que estão invertidas e repetidas internamente diferem em topologia. Assim, ca_s é rica em citosina e guanina, enquanto apenas 1% da região terminal a_1b , designada como sub-região a_1 , é rica em citosina e guanina.

McGeoch *et al.* (1988) determinaram a sequência de DNA da região única longa (U_L) no genoma de uma cepa de HSV-1. A sequência U_L continha 107.943 resíduos e uma composição de bases de 66,9% G+C. Esses autores também descreveram a sequência completa da região U_s , a sequência completa de R_s , uma parte da sequência R_L e partes da sequência U_L (MCGEOCH *et al.*, 1985; DAVISON; WILKIE, 1981; MURCHIE; MCGEOCH, 1982; MCGEOCH *et al.*, 1986; PERRY *et al.* 1986; PRESTON; MCGEOCH, 1981; QUINN; MCGEOCH, 1985; DALRYMPLE *et al.* 1985; MCGEOCH; DOLAN; FRAME, 1986; MCGEOCH; DAVISON, 1986; DAVISON; SCOTT, 1986a).

Com esses trabalhos, a sequência completa do DNA de HSV-1 foi determinada, dando um comprimento total do genoma de 152.260 resíduos de composição de bases de 68,3% G+C. No genoma completo do HSV-1, foram reconhecidos 72 genes que codificam 70 proteínas distintas. A disposição do gene U_L encontrada foi bastante similar à sua parte correspondente do gene de VZV, e sequências de aminoácidos para proteínas equivalentes mostraram uma série de similaridades (MCGEOCH *et al.*, 1988).

A sequência de DNA genômico da cepa HG52 do HSV-2 foi determinada com 154.746 pb e com um conteúdo de 70,4% de G+C. Um total de 74 genes codificando proteínas distintas foram identificados, sendo que três desses estavam

presentes em duas cópias cada, dentro dos elementos de repetição principais do genoma (DOLAN *et al.*, 1998).

HSV-1 e HSV-2 apresentam um elevado grau de similaridade, tanto nas suas manifestações clínicas quanto em seu aspecto molecular (SCHLEISS, 2009). Por meio de testes de hibridização, Kieff *et al.* (1972) constatou uma homologia de aproximadamente 40% das regiões do DNA de ambos os vírus.

Honess e Roizman (1974) elaboraram um experimento em que células infectadas com HSV foram tratadas com inibidores de síntese de proteínas em diferentes intervalos durante o ciclo reprodutivo viral, a fim de estudar a natureza da geração de polipeptídeos virais. Com base em medições na taxa de síntese de polipeptídeos de células infectadas durante todo o ciclo de crescimento do HSV, ficou aparente que os polipeptídeos formam múltiplas classes, diferindo em padrões temporais de sua síntese por toda a infecção. O reconhecimento dessas classes “temporais” indica a existência de regulação coordenada da síntese de polipeptídeos virais.

Esses experimentos mostraram que os polipeptídeos virais formam três grupos sequencialmente sintetizados e coordenadamente regulados, designados α , β e γ . O grupo α , contendo um polipeptídeo estrutural menor e vários polipeptídeos não estruturais, foi sintetizado em maior quantidade de 3 a 4 horas após a infecção, com taxas que diminuíram posteriormente. O grupo β , também contendo polipeptídeos estruturais menores e não estruturais, foi sintetizado em maiores taxas de 5 a 7 horas, diminuindo posteriormente. O grupo γ , contendo os principais polipeptídeos estruturais, foi sintetizado em taxas crescentes até pelo menos 12 horas após a infecção. A síntese de α peptídeos não necessitou da síntese de proteínas prévias. Em contraste, a síntese de β polipeptídeos necessitou da síntese prévia de α polipeptídeos, assim como a síntese de novo RNA (HONESS; ROIZMAN, 1974).

As terminações nervosas sensitivas são os primeiros alvos da infecção pelo HSV (SIMMONS, 2002; GILDEN *et al.*, 2007). Linfócitos e outros leucócitos também podem ser infectados por HSV, um fenômeno de significância desconhecida no que diz respeito à efetividade da resposta imunológica. Geralmente, a propagação da infecção é pelo contato célula-célula e não pela via hematogênica ou pela rota linfática (SPEAR, 2004).

Uma vez dentro dos neurônios do gânglio sensorial (tipicamente o gânglio trigêmeo, mas os vírus também podem infectar os gânglios cervical superior e pterigopalatino), o DNA do HSV-1 se circulariza para estabelecer a infecção latente. Durante a latência do HSV-1, a transcrição dos genes líticos é fortemente reprimida e o único transcrito que se acumula em abundância é o gene chamado transcrito associado à latência (LAT). Não há evidência direta de que LAT codifique um peptídeo, e o único fenótipo apresentado por um número de mutantes LAT, tanto em modelos de camundongos como de coelhos, é uma redução na frequência de reativação (BLOOM, 2004).

Perng *et al.* (2000), comparando cepas mutantes de HSV-1 sem o gene LAT (LAT-) e cepas selvagens com o gene LAT (LAT+), observaram extensa apoptose dos neurônios de coelhos infectados com o gene LAT- e muito baixa apoptose em neurônios de coelhos com a cepa LAT+. Também observaram que plastídios expressando LAT bloquearam a apoptose em células de cultura. Dessa forma, concluiu-se que LAT promove sobrevivência neuronal após a infecção do HSV-1 pela redução do processo de apoptose.

Neurônios dos gânglios sacrais tradicionalmente são considerados o local de latência do HSV-2. A verificação da latência do HSV-2, usando técnicas de PCR, demonstrou que ela ocorre em gânglios em todo o eixo do SNC, embora em menor frequência do que nos gânglios sacrais. A latência do HSV-2 também foi demonstrada no gânglio trigêmio. A latência difundida do HSV-2 sugere que o vírus possa alcançar gânglios distantes do local da infecção primária. Os mecanismos moleculares básicos da latência do HSV são incompreendidos (BERGER; HOUFF, 2008).

2.1.2.3 VZV

Ludwig *et al.* (1972) foram os primeiros a demonstrar um conteúdo de 46% de C+G no DNA de VZV. Dumas *et al.* (1979) isolaram o DNA do VZV do vírus purificado e determinaram o peso molecular correto aproximado do DNA de 80×10^6 .

O VZV foi o primeiro membro da subfamília *Alphaherpesvirinae* com genoma completamente caracterizado. A sequência completa do genoma compreende

124.884 pb, podendo variar de tamanho. O genoma contém 70 genes distribuídos igualmente entre as duas fitas de DNA (DAVISON; SCOTT, 1986).

O genoma do VZV é uma molécula de DNA linear fita dupla formada por dois segmentos unidos covalentemente, L e S. O segmento L compreende uma sequência única (UL; aproximadamente 100.000 pb) flanqueada por uma pequena inversão repetida (TRL e IRL; 88,5 pb). S contém uma sequência única (US; 5.232 pb) flanqueada por uma grande inversão repetida (TRS e IRS; 7319,5 pb). O genoma não é terminal redundante e possui um resíduo C não pareado no final 3' do L e um resíduo não pareado no final 3' do S. O DNA do vírion contém dois arranjos grandes e pequenos diferentes do genoma na orientação relativa dos segmentos L e S. Enquanto que uma orientação do segmento S é presente em 50% das moléculas de DNA do vírion e a outra nos 50% restante, uma orientação do segmento L é presente em aproximadamente 95% das moléculas e a outra em apenas 5%. (DAVISON; SCOTT, 1986).

Após a infecção primária, o VZV torna-se latente nos nervos cranianos, gânglios do sistema nervoso autônomo e em toda a extensão das raízes dorsais. A forma predominante de transmissão do VZV é a via respiratória e a viremia ocorre após a replicação do vírus no trato respiratório (GILDEN *et al.*, 2007).

A viremia associada ao VZV e o linfotropismo foram documentados durante a varicela, o herpes zoster e a neuralgia pós-herpética (NPH). Durante a varicela, células T são infectadas produtivamente, provavelmente contribuindo para a propagação do vírus (GILDEN *et al.*, 2007).

2.1.2.4 EBV

Dambaugh *et al.* (1984) sequenciaram o domínio U2 de isolados de EBV e encontraram divergências entre diferentes cepas isoladas. Essas estão correlacionadas com diferenças em suas proteínas nucleares EBNA2 expressas em linfócitos-B, em que o vírus está latente.

Dolan *et al.* (2006) foram os primeiros a relatarem a sequência completa do genoma do EBV2, que contém 172.764 pb. A sequência foi interpretada contendo pelo menos 80 genes codificadores de proteínas. A comparação com a sequência de EBV1 demonstrou que as duas sequências são colineares e muito próximas. As

comparações genômicas indicam que os dois tipos de EBV devem ser considerados como pertencentes à mesma espécie de vírus.

Antes da entrada do vírus no linfócito B, a principal glicoproteína do envelope viral, gp350, se liga ao receptor viral, a molécula CD21 – receptora do complemento C3d (SCHLEISS, 2009). Fingerth *et al.* (1984) foram os pesquisadores que identificaram a proteína de membrana CR2 de linfócitos B humanos como sendo a receptora de entrada do EBV nessas células, utilizando anticorpos monoclonais. Essa interação receptor-ligante tem implicações para o tropismo da doença no hospedeiro humano, uma vez que os principais locais onde o receptor CD21 se expressa são no epitélio da orofaringe e na superfície das células B. Infecções das células epiteliais pelo EBV *in vitro* resultam em replicação ativa, com produção do vírus e lise celular. Em contraste, infecção de células B pelo EBV *in vitro* resulta em infecção latente, com imortalização das células. *In vivo* humano o EBV permanece latente em células B. A replicação viral é ativada espontaneamente apenas em uma pequena porcentagem dessas células (SCHLEISS, 2009).

2.1.2.5 CMV

Dolan *et al.* (2004) sequenciaram uma cepa de CMV com poucas passagens em cultura celular (cepa Merlin). O genoma de Merlin contém 235.645 pb com componentes de UL de 193.019 pb, Us 35.481 pb e Rs 2.537 pb. A sequência a, que é parte da RL e Rs, contém 578 pb. CMV possui um genoma aproximadamente duas vezes maior do que os demais herpesvírus, codificando mais de 200 genes. Apresenta variabilidade em sua sequência de DNA e, quando adaptado ao crescimento *in vitro*, adquire extensas deleções nucleotídicas (GILDEN *et al.*, 2007).

Todos os mamíferos parecem ser infectados por citomegalovírus espécie-específico, e não há evidências de infecções cruzadas entre espécies na natureza. O homem é o único hospedeiro natural do CMV (SCHLEISS, 2009).

O CMV já foi recuperado a partir de urina, saliva, leite materno, fezes, lágrimas e sêmen (WELLER; PEARSON, 2000). Dentro do corpo humano, o CMV pode se espalhar para praticamente qualquer tecido, devido a uma ampla quantidade de tipos de células-alvo (SINGER; DIGEL; JAHN, 2008).

Pouco se sabe sobre o local ou os mecanismos de latência do CMV. Estudos indicam que monócitos e granulócitos sejam portadores CMV e locais de latência e persistência (TAYLOR-WIEDEMAN *et al.*, 1991; BOLOVAN-FRITTS; MOCARSKI; WIEDEMAN, 1999). Transplantes de órgãos sólidos podem transmitir CMV, portanto, é possível que essas células possam abrigar e transmitir o vírus, como também é possível que outras células, além das mencionadas, possam contê-lo e transmiti-lo (LJUNGMAN; HAKKI; BOECKH, 2010).

2.1.2.6 HHV-6

Gompels *et al.* (1995) determinaram a sequência completa do HHV-6. O genoma tem 159.321 pb de tamanho, uma composição de 43% de G+C de bases e contém 119 fases abertas de leitura (ORFs). A estrutura geral possui 143 Kb delimitada por 8 Kb de repetições diretas, DRL (esquerda) e DRR (direita), contendo 0,35 Kb de repetições simples teloméricas terminais e juncionais. O genoma contém 102 genes separados, prováveis codificadores de proteínas. Os genes estão arranjados colinearmente com os genomas de outros *betaherpesvírus* previamente sequenciados, como o CMV, e possuem um arranjo distinto de genes conservados em comparação ao *gammaherpesvírus* sequenciado, como o EBV e os *alphaherpesvírus* VZV e HSV.

As proteínas codificadas pelo HHV-6 mostraram uma relação próxima em número e similaridade aos produtos do CMV, com aproximadamente 67% de proteínas homólogas em comparação aos 21% identificados em todos os herpesvírus. Além dos genes conservados, o genoma contém quatro famílias distintas de genes que podem estar envolvidas na evasão imune e persistência em células imunes: duas possuem similaridade com a quimiocina da família das citocinas quimiostáticas/proinflamatórias; uma aos receptores peptídicos acoplados à proteína-G; e uma quarta da superfamília das imunoglobulinas.

Células T CD4⁺ são os principais locais da replicação ativa do HHV-6, todavia, o tropismo celular é amplo e inclui células T CD8⁺, macrófagos, células *natural killer*, células da glia e células epiteliais, incluindo células endoteliais na veia umbilical humana e fibroblastos pulmonares. He *et al.* (1996) demonstraram que o

HHV-6A e HHV-6B podem infectar astrócitos fetais humanos altamente purificados *in vitro* (YOSHIKAWA; ASANO, 2000).

Kondo *et al.* (1991) detectaram DNA de HHV-6 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com exantema súbito, durante fases agudas da infecção e também de convalescença usando a PCR. Ao encontrarem DNA viral, mas não sinais de replicação ativa em células de cultivo, eles sugeriram que o HHV-6 pode infectar e se tornar latente em monócitos.

2.1.2.7 HHV-7

Fremkel *et al.* (1990) isolaram o HHV-7 pela primeira vez a partir de células T CD4+ purificadas, provenientes de sangue periférico de um indivíduo sadio com 26 anos de idade, sob condições que promoveram a ativação dessas células. Esse isolado foi denominado como HHV-7 cepa RK.

Nicholas (1996) determinou e analisou a sequência completa do DNA do HHV-7 da cepa JI. A sequência nucleotídica contém 144.861 pb e consiste de uma região única (U) de 133.233 pb, flanqueada por uma repetição grande direta (DR) de 5.814 pb. Um total de 101 ORF potenciais codificadoras de proteínas foram identificadas, oito delas presentes em ambas as cópias de DR. A relação biológica próxima entre o HHV-6 e o HHV-7 se reflete geneticamente e há um elevado grau de conservação do conteúdo genético e sequências de aminoácidos codificadas. Existe uma divergência de *loci* entre os genomas de HHV-6 e HHV-7 que ocorre no terminal genômico, na região dos elementos terminais de repetição direta e em regiões limitadas do componente único. Divergências evolucionárias e biológicas de potencial significância entre HHV-6 e HHV-7 são diferenças estruturais notáveis em genes regulatórios transcricionais putativos, especificadas pela região *loci* A direta invertida e região de início imediato desses vírus.

Megaw *et al.* (1998) determinaram a sequência de DNA completa da cepa RK de HHV-7 e revelaram que, apesar de uma relação muito próxima entre as cepas RK e JI, diferenças são aparentes em regiões que contém reiterações em *tandem*, particularmente nas reiterações teloméricas localizadas próximas ao terminal das repetições diretas grandes nos terminos genômicos e em um total de 179 posições adicionais, distribuídas por todo o genoma (aproximadamente uma diferença

nucleotídica por Kb). O genoma de HHV-7 contém 84 diferentes genes. Todos os genes de HHV-7, exceto um, possuem homólogos diretos em HHV-6 e todos, exceto dois genes de HHV-6, possuem homólogos HHV-7. Comparações de sequências entre HHV-7 e HHV-6 fornecem evidências de que regiões codificadoras de proteínas de 11 genes são expressas por *splicing*.

Zhang *et al.* (2001) avaliaram infecções de HHV-7 em macrófagos *in vitro* e seus resultados sugerem que esse vírus pode infectar essas células, sendo que a infecção pode persistir por longos períodos.

2.1.2.8 HHV-8

O HHV-8 contém 86 genes, dos quais pelo menos 22 são potencialmente imunomodulatórios. Estima-se que 10% dos genes codificados pelo HHV-8 promovam o desenvolvimento do sarcoma de Kaposi, devido a atividades mitogênicas, antiapoptóticas, quimioatrativas, angiogênicas ou transformantes (SCHLEISS, 2009).

O genoma do vírion consiste de uma região única (U) flanqueada em cada término por números variáveis de uma repetição direta (TR), totalizando 35-45, dando ao genoma um tamanho de aproximadamente 170 Kb. Cada terminação do genoma finaliza com uma cópia parcial de TR, de forma que a circularização gera uma cópia completa (REZAEI *et al.*, 2006).

HHV-8 é o herpesvírus humano mais recentemente descrito. Utilizando a PCR baseada em análise subtrativa, Chang *et al.* (1994) detectaram segmentos de genoma HHV-8 em células de um tumor de sarcoma de Kaposi (SK), o tumor mais comum encontrado em pacientes com AIDS. Esse vírus é também encontrado na saliva de uma grande quantidade de pacientes com o vírus da imunodeficiência humana. Como o EBV, HHV-8 codifica uma latência antígeno nuclear associada, que liga o epissoma viral ao cromossomo do hospedeiro (CHANG *et al.*, 1994; GILDEN *et al.*, 2007).

O vírus HHV-8 tem tropismo particularmente para as células B CD19+ e também parece infectar células endoteliais *in vivo*, células que são as precursoras do sarcoma de Kaposi (SCHLEISS, 2009).

A saliva é a principal fonte de transmissão do HHV-8, mas estudos adicionais, sugerindo a importância de rotas verticais, sexuais, transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea, têm sido relatados (PICA; VOLPI, 2007) .

2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES NEUROLÓGICAS POR HERPESVÍRUS

Nos EUA, o número anual de infecções no SNC que ocorrem devido a agentes virais é muito superior ao das infecções causadas por bactérias, leveduras, fungos e protozoários somados (ROMERO; NEWLAND, 2003). A incidência anual das infecções virais agudas no SNC, no Canadá, foi estimada em 19,5/100.000 indivíduos e o pico de incidência foi em crianças de seis meses ou menos (WANG; BORTOLUSSI, 1981).

No Brasil, em média, são notificados 11.500 casos/ano de meningite de provável etiologia viral. Entretanto, na maioria dos casos, não há identificação do agente etiológico. Em 2006, 7.247 casos de internações hospitalares pelo SUS foram devidos às meningites virais (SINAN, 2006). Em 2010, foram notificados 7.795 casos de prováveis meningites virais em todo o Brasil, sendo 523 no estado do Paraná (BRASIL, 2007; 2010).

Poucos estudos foram realizados no Brasil para determinar a prevalência ou incidência das infecções virais no SNC (MENDOZA, 2007). No Hospital de Clínicas de Porto Alegre foi realizado um estudo com a metodologia de *nested* PCR para detecção de 17 diferentes patógenos, entre eles vírus, bactérias e protozoários, em 383 pacientes com indicações clínicas e laboratoriais de meningites ou encefalites. Os vírus EBV, CMV e HSV foram os microrganismos mais predominantes (CHESKY *et al.*, 2000).

Embora a encefalite por HSV-1 ocorra com uma regularidade confiável, em todo o mundo ocorrem mudanças na epidemiologia de outras causas virais. Por exemplo, o CMV, o EBV e, em certa medida, o HHV-6 estão sendo vistos com maior frequência porque ocorrem em pacientes imunodeprimidos pelo HIV, transplante ou quimioterapia para câncer (SOLOMON; HART; BEECHING, 2007), doenças que têm sido mais frequentes nos últimos anos.

2.2.1 HSV-1 e HSV-2

A maioria da população mundial foi infectada pelo HSV. Em países menos desenvolvidos, a soroconversão ocorre nos primeiros anos de vida (cinco anos em aproximadamente um terço das crianças e em cerca de 70% a 80% na adolescência). Em comparação, indivíduos de classe média ou classe alta em países mais desenvolvidos se infectam mais tarde – a soroconversão ocorre em cerca de 20% das crianças com menos de cinco anos de idade e nenhum aumento substancial ocorre até as idades de 20 a 40 anos (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

A encefalite por HSV é considerada a mais comum encefalite esporádica não sazonal (LIVORSI *et al.*, 2010). Ela ocorre em todas as idades e em ambos os sexos (WHITLEY *et al.*, 1982), embora alguns estudos relatem uma predominância de encefalite causada por HSV em pessoas de meia idade e idosos (KOSKINIEMI *et al.*, 1996). Em adultos imunocompetentes, mais de 90% dos casos de encefalites por HSV resultam da infecção pelo HSV-1, sendo o restante devido à infecção pelo HSV-2 (AURELIUS *et al.*, 1993). A encefalite por HSV é rara na população transplantada (GOMEZ *et al.*, 1997).

Anualmente, estima-se que a encefalite por HSV ocorra em aproximadamente dois ou três indivíduos por milhão da população (SKÖLDENBERG, 1996). A incidência da encefalite causada pelo HSV na população de Viena, Áustria, é de um caso por 469.000-577.000 indivíduos por ano (PUCHHAMMER-STÖCKL *et al.*, 2001). A incidência da encefalite causada pelo HSV nos EUA é de um caso por 250.000 indivíduos por ano – aproximadamente 1.250 casos por ano (WHITLEY; ROIZMAN, 2001) –, enquanto na Suécia é de um caso por 400.000 indivíduos por ano (SKÖLDENBERG *et al.*, 1984).

Tang *et al.* (1999a) realizaram um estudo com detecção prospectiva de DNA de HSV em amostras de LCR, entre 1993 e 1997, nos EUA. Na análise de 139 casos de pacientes com amostras positivas para DNA de HSV em que o gênero era conhecido, 74 (53%) eram masculinos.

Momméja-Marin *et al.* (2003) relatam uma prevalência de meningites causadas pelo HSV de 2% em um período de sete anos. Das 919 amostras de LCR obtidas, 3,3% foram positivas para DNA de HSV por PCR, seguida de hibridização por sondas.

Embora a meningite recorrente devido a HSV-2 seja principalmente vista em jovens adultos sexualmente ativos, um surpreendente número de episódios de meningites por HSV-2 pode se desenvolver em pacientes idosos. A meningite recorrente já foi relatada ocorrer pela primeira vez após 57 anos de um único episódio de infecção por herpes simplex genital (DAVIS; GUERRE; GERSTEIN, 2010). Aproximadamente 50% dos pacientes que tiveram meningite ou mielorradiculite por HSV-2 apresentaram recidivas suspeitas ou confirmadas durante o ano seguinte à fase aguda (AURELIUS *et al.*, 2002).

Estima-se que 45 milhões de pessoas nos EUA tenham infecção pelo HSV-2 (FLEMING *et al.*, 1997). A disseminação do HSV-2 para o SNC ocorre em 70% de todos os neonatos infectados (BERGER; HOUFF, 2008), sendo que 5% das mulheres que têm o HSV isolado no período do parto têm neonatos com infecções por HSV (BROWN *et al.*, 2003). Setenta por cento de todos os neonatos com encefalites por HSV nascem de mães sem sinais e sintomas de herpes genital. Estudos recentes sugerem que 30% das encefalites neonatais são causadas pelo HSV-1. O risco de encefalite durante uma infecção primária com HSV-1 ou HSV-2 é de 50%. A meningite asséptica ocorre em 36% das mulheres com infecção genital primária por HSV-2 e em 13% dos homens (COREY *et al.*, 1983).

O estudo de Rantalaio *et al.* (2001) mostra a taxa de mortalidade dos pacientes com encefalite por HSV confirmada de 27%, indicando a sua extrema gravidade. Nenhum caso de encefalite por HSV fatal foi identificado desde 1983, sendo que o Aciclovir tem sido utilizado rotineiramente desde esse ano na maioria dos casos. Em grupos de jovens, a taxa de mortalidade entre os pacientes com encefalite por HSV foi relativamente baixa, enquanto foi de 12% entre 35 e 64 anos e 60% em pacientes de ≥ 65 anos de idade (RANTALAIHO *et al.*, 2001).

No estudo de Hjalmarsson, Blomqvist e Sköldenberg (2007), entre os pacientes com encefalite por HSV-1, a mortalidade foi de 14% em um ano.

Em pacientes com encefalites por HSV não tratadas, a mortalidade excede 70% e apenas 2-3% dos sobreviventes retornam à função neurológica normal. Mesmo com a utilização de terapia antiviral, substanciais mortalidade e morbidade ocorrem em 19% dos pacientes (SKOLDENBERG *et al.*, 1984; WHITLEY *et al.*, 1986; KIMBERLIN, 2007).

Em bebês com encefalites por HSV, embora a taxa de mortalidade seja de 5%, acima de 50% dos sobreviventes permanecem com comprometimento neurológico (WHITLEY, 2004).

Aurelius *et al.* (2002) estudaram quarenta pacientes com meningites e ou mielorradiculite por HSV-2 e verificaram que, durante o primeiro ano após a fase aguda da doença, recorrências neurológicas suspeitas ou confirmadas foram verificadas em 45% dos pacientes. Segundo os autores, uma considerável morbidade pode ocorrer em pacientes com meningite ou mielorradiculite por HSV-2.

2.2.2 VZV

Estima-se que o VZV afete entre 600.000 a 1.000.000 de norte-americanos a cada ano (OXMAN *et al.*, 2005). A incidência de complicações do SNC relacionadas ao VZV varia de 0,1% a 0,75% (APPLEBAUM; RACHELSON; DOLGOPOL, 1953; BOUGHTON, 1966; HEPPLESTON; PEARCE; YATES, 1959; REULER; CHANG, 1984).

Entre indivíduos saudáveis, a encefalite por VZV é uma complicação grave, vista com maior frequência em crianças e adultos, com uma incidência de um a dois casos por 10.000 casos de varicela (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; GILDEN, 2001b; GNANN, 2002). A prevalência das lesões causadas pelo VZV no sistema nervoso em pacientes com AIDS é de 2% a 4% (PETITO *et al.*, 1986; GRAY *et al.* 1994).

Na Finlândia, em um período de 24 anos, o VZV foi o segundo agente etiológico identificado com maior frequência em adultos com encefalite aguda (5%). A principal causa de encefalites em pacientes com 65 anos de idade ou mais foi o VZV (32%) (RANTALAIHO *et al.*, 2001).

Ziebold *et al.* (2001) coletaram informações de todas as admissões de crianças com complicações graves associadas à varicela, ao longo do ano de 1997, de todos os 485 hospitais pediátricos da Alemanha, utilizando um sistema de vigilância estabelecido. Foram incluídos indivíduos não imunocomprometidos. A maioria das complicações ocorreram em crianças na fase pré-escolar com idade máxima de 4 anos. As complicações mais frequentes foram neurológicas, relatadas em 61,3% das crianças. O principal diagnóstico foi cerebelite, 40%, seguido por

encefalite com 18%, meningite, 1,7%, e paralisia facial central com 0,8%. Observou-se uma incidência importante de complicações graves relacionadas à varicela em indivíduos com até 16 anos de idade, sendo calculada em 8,5 casos por 100.000 habitantes. Os resultados desse estudo demonstram considerável morbidade com uma taxa relativamente alta de encefalite.

Segundo Ziebold *et al.* (2001), não foi encontrado predomínio de sexo em crianças com complicações graves associadas à varicela, com uma distribuição de 47% dos pacientes do sexo feminino e 53% do sexo masculino. Esses autores também constataram uma distribuição sazonal nas complicações graves associadas à varicela.

A encefalite difusa associada ao VZV está associada a uma alta taxa de mortalidade – de 5% a 35% (LUBY, 1973; PREBLUD; D'ANGELO, 1979). Conforme Ziebold *et al.* (2001), foram observadas sequelas em 1,7% das crianças que apresentaram *deficit* persistente após complicações neurológicas associadas à varicela.

2.2.3 EBV

A prevalência da infecção pelo EBV varia de 20% a 80% em indivíduos de dois a três anos. Em países industrializados, é mais comum a infecção primária ocorrer na adolescência. Complicações neurológicas ocorrem em cerca de 5% dos pacientes (JUNKER, 2005).

A incidência de envolvimento neurológico em pacientes hospitalizados, devido a complicações da infecção primária pelo EBV, tem sido relatada em 5,5% a 18% dos indivíduos (SILVERSTEIN; STEINBERG; NATHANSON, 1972). Quando apenas anormalidades de LCR são consideradas, a incidência é de 26,5% (PEJME, 1964). EBV é o agente etiológico de até 5% de todos os pacientes com encefalites virais agudas (KENNARD; SWASH, 1981).

Infecções por EBV no SNC são comuns em pacientes com HIV avançado na Tailândia, sendo detectado em 22% dos pacientes com sintomas no SNC (ROJANAWIWAT *et al.*, 2005). DNA de EBV tem sido detectado em tecidos tumorais de praticamente todos os linfomas do SNC relacionados à AIDS (MACMAHON *et al.*, 1991; PEDNAULTT; KATZ; MILLER, 1992).

Sugere-se que a mortalidade da encefalite por EBV possa chegar a 33% e que aqueles que sobrevivem possam ser afetados a longo prazo (JUEL-JENSEN, 1987), embora outros autores tenham descrito a doença como relativamente benigna e com poucas sequelas (LANGE *et al.*, 1976).

Deficiências neurológicas residuais ocorrem em encefalites causadas por EBV e têm sido relatadas predominantemente em adultos (DOMACHOWSKE *et al.*, 1996). Bray *et al.* (1992) relataram seis casos de pacientes sofrendo dessa deficiência em associação com infecção primária por EBV.

Em uma revisão de 12 casos em que a infecção pelo EBV foi complicada por manifestações neurológicas, oito pacientes tiveram encefalites. Esses oito pacientes tinham entre 13 e 22 anos de idade e apresentaram uma doença autolimitada com uma duração média de 25 dias. Entre 1 a 14 anos após a doença aguda, nenhum paciente apresentou evidências de *deficit* neurológico ou sequelas (SCHNELL *et al.*, 1966).

De acordo com Silverstein, Steinberg e Nathanson (1972), complicações neurológicas da mononucleose infecciosa têm um bom prognóstico com recuperação completa observada em 85% dos casos, contudo, uma taxa de mortalidade de 11% tem sido relatada por outros estudiosos (DAVIE; CEBALLOS; LITTLE, 1963).

2.2.4 CMV

A soroprevalência mundial do CMV é de aproximadamente 60% a 100% da população de imunosuprimidos e imunocompetentes (RAFAILIDIS *et al.*, 2008). A cada ano, nos EUA, aproximadamente 35.000 crianças nascem infectadas com CMV, sendo que 8.000 dessas apresentam sequelas, como perda de visão, perda auditiva, retardo mental ou outras anormalidades neurológicas e até a morte (FOWLER *et al.*, 1992; BOPPANA *et al.*, 1999).

O CMV é o patógeno oportunista mais comum em pacientes com infecção avançada por HIV, podendo estabelecer infecção ativa no sistema nervoso (DREW, 1992; MCCUTCHAN, 1995; ROULLET, 1999). Evidências de infecção pelo CMV no SNC são encontradas em aproximadamente 15% dos pacientes com AIDS (GONZALES; DAVIS, 1988). Outros estudos relatam uma incidência de até 25%

(PETITO *et al.*, 1986). A encefalite pelo CMV ocorre em até 30% dos pacientes imunocomprometidos e também é vista ocasionalmente em hospedeiros imunocompetentes (SCHNECK, 1965; COHEN; COREY, 1985).

Estudos clínicos realizados em países desenvolvidos, na era do uso de tratamento antirretroviral altamente ativo (HAART), relatam uma prevalência de encefalite por CMV < 2% (MASCHKE *et al.*, 2000). Valores similares foram relatados em estudos no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2006; VIDAL *et al.*, 2008).

Arribas *et al.* (1996) estabeleceram a frequência da encefalite causada por CMV em adultos em um período de trinta anos. De 676 pacientes que receberam o diagnóstico de encefalite por CMV, 85% eram HIV positivos, 12% tinham outras causas de imunossupressão e 3% eram saudáveis. A encefalite por CMV foi confirmada durante autópsia em 12% dos pacientes HIV positivos e 2% de receptores de transplantes.

Gozlan *et al.* (1995) constataram um predomínio de pacientes masculinos (93%) com amostras de LCR positivas para DNA de CMV, contudo, a razão da amostragem inicial de pacientes com resultados de PCR positivos e negativos (n = 164) M:F foi de 10:1.

Silva *et al.* (2010) observaram uma mortalidade em 38% dos pacientes com AIDS com sintomas no SNC relacionados à presença de DNA de CMV LCR.

2.2.5 HHV-6

O HHV-6 é ubíquo na população humana e aproximadamente 90% dos adultos são soropositivos (LEVY, 1997). HHV-6 pode ser detectado na saliva de 2% a 3% das crianças com idades de três anos e em cerca de 25% dos adultos (KOMAROGF *et al.*, 2006).

A ocorrência de doenças no SNC em adultos imunocompetentes, que são atribuídas ao HHV-6, é limitada a poucos relatos de caso (DEWHURST, 2004). Chan *et al.* (1999) encontraram DNA de HHV-6 em amostras de biópsia de tecido cerebral de 42,9% (36/84) de pacientes imunocompetentes.

Em estudo prospectivo sobre encefalite em mais de 1.000 indivíduos imunocompetentes, com duração de cinco anos, foram encontrados relativamente poucos casos de infecção pelo HHV-6 por PCR. No entanto, o teste não foi muito

sensível e os estudos sorológicos (anticorpos contra antígenos precoces) de LCR sugeriram uma maior incidência de infecção pelo HHV-6 (KOMAROFF *et al.*, 2006).

O HHV-6 tem sido relatado como causa de encefalite em pacientes que sofreram transplante de medula óssea (WANG *et al.*, 1999; CHIK *et al.*, 2002; ZERR *et al.*, 2002). DNA de HHV-6 foi detectado em LCR de 23% dos pacientes de transplante de medula óssea com sintomas no SNC (WANG, 1999).

Grande porcentagem de crianças com encefalites por HHV-6 (60%) apresentam comprometimento cognitivo duradouro. Em pacientes transplantados, o HHV-6 causa encefalite com uma taxa de mortalidade de 40% e *deficit* cognitivo residual em muitos indivíduos (KOMAROFF *et al.*, 2006).

McCullers, Lakeman e Whitley (1995) detectaram DNA de HHV-6 no LCR de 9 de 138 pacientes com encefalites. Quatro dos nove pacientes se recuperaram completamente e não demonstraram deficiências neurológicas residuais em dois anos de acompanhamento. Três pacientes apresentaram comprometimento neurológico leve a moderado, como perda de memória, atraso no desenvolvimento, diminuição do desempenho no trabalho e outros sinais encontrados nos dois anos de acompanhamento. Um paciente apresentou convulsões graves e persistentes por dez anos e outro paciente morreu dois meses após apresentar complicações de sua doença neurológica.

2.2.6 HHV-7

O HHV-7 é ubíquo na população humana e aproximadamente 90% dos adultos são soropositivos (LEVY, 1997). A infecção primária pelo HHV-7 ocorre mais tarde que o HHV-6 e é adquirida entre os primeiros cinco ou seis anos de idade, sendo que aproximadamente 65% das crianças britânicas são infectadas aos três anos de idade (WARD, 2005).

Chan *et al.* (1999) encontraram DNA de HHV-7 em amostras de biópsia de tecido cerebral de 4% (3/84) dos pacientes imunocompetentes. Um estudo prospectivo em crianças imunocompetentes com encefalite revelou infecção com HHV-6 e HHV-7 em 17% delas.

Muito pouco se sabe sobre as possíveis consequências da infecção do HHV-7 no SNC de imunocomprometidos (WARD, 2005). Foram relatados casos de

encefalite, meningite e mielite associados ao HHV-7 após transplante de medula óssea, sugerindo que o HHV-7 possa ser patogênico nessas circunstâncias (CHAN *et al.*, 1997; CHAN *et al.*, 2002; WARD *et al.*, 2002b; YOSHIKAWA *et al.*, 2003).

Chan *et al.* (2000) avaliaram a presença de DNA de HHV-7 em materiais de autópsia de trinta indivíduos, nos quais a relação de masculinos e femininos era de 2:1. Onze indivíduos tinham DNA do vírus no material estudado e a relação de masculinos e femininos nesses pacientes foi de 9:2. Pohl-koppe *et al.* (2001) avaliaram a presença de HHV-7 no LCR de 68 indivíduos com sintomas no SNC por PCR *end-point* de única etapa e encontraram presença do vírus em seis pacientes, sendo quatro deles do sexo masculino (67%).

Yoshikawa *et al.* (2000) encontraram DNA de HHV-7 no LCR de 14% (6/43) dos pacientes com sinais e sintomas neurológicos e com suspeita de meningite, em que 50% eram do sexo masculino.

2.2.7 HHV-8

A soroprevalência do HHV-8 é altamente variável, dependendo da geografia e de fatores de risco comportamentais (MELBYE *et al.*, 1998; FU *et al.*, 2009). Em uma amostragem de 13.984 norte-americanos, 1,5% foram diagnosticados como soropositivos para HHV-8 (ENGELS *et al.*, 2007). A maior taxa de soropositividade do HHV-8 nos EUA foi encontrada em homens que têm relações sexuais com homens, com uma taxa de prevalência estimada de 8,2% (ENGELS *et al.*, 2007). Estima-se que algumas áreas da África subsaariana possuam de 30% a 50% de soropositividade (BUTLER *et al.*, 2009).

HHV-7 e HHV-8 foram detectados, respectivamente, em 3,6% e 2,3% das amostras de tecidos cerebrais de pacientes imunocompetentes que não apresentavam sinais de doenças virais (CHAN *et al.*, 1999). HHV-8 foi diagnosticado por PCR no LCR de 1,7% de 115 pacientes HIV positivos em investigação de doenças no SNC (BRINK *et al.*, 1998). Said *et al.* (1997) publicaram um caso de encefalite causada pelo HHV-8 em paciente imunossuprimido.

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS INFECÇÕES NEUROLÓGICAS POR HERPESVÍRUS

O envolvimento dos herpesvírus no SNC pode ocorrer de diversas formas (BASKIN; HEDLUND, 2007). Os vírus mostram diferenças em sua propensão para infectar o SNC e para infectar alguns tipos de células do cérebro. O conhecimento sobre o neurotropismo fornece a base para certos tipos de fenótipos clínicos mostrados por diferentes vírus (KENNEDY, 2005).

Dependendo do vírus, a patogênese das infecções no SNC consiste de uma mistura de lesão celular direta (efeito citopático) e/ou uma resposta imune mediada. Para a maioria dos vírus, o parênquima cerebral ou os neurônios são infectados primeiramente, mas, para alguns, os vasos sanguíneos são lesados, levando a uma grave vasculite. Também pode ocorrer desmielinização seguida de infecção. Um dos principais meios pelos quais os vírus entram no SNC é durante uma viremia e subsequente propagação por meio da barreira hematoencefálica (SOLOMON; HART; BEECHING, 2007).

2.3.1 HSV-1 e HSV-2

A encefalite por herpes simplex é uma das formas mais conhecidas do comprometimento do SNC por herpesvírus. Os sinais e sintomas podem incluir febre, cefaleia, letargia, irritabilidade, confusão, *deficit* focal, afasia e convulsões, que refletem na replicação viral acompanhada de inflamação no lobo médio temporal e na superfície orbital do lobo frontal. Os sobreviventes podem apresentar convulsões permanentes, mudanças no *status* mental, afasia ou *deficit* motor (GILDEN *et al.*, 2007).

A encefalite por HSV causa um dano seletivo ao sistema límbico, envolve gravemente a formação hipocampal, incluindo a região cortical, a amígdala e o giro para-hipocampal (DAMASIO; VAN HOESEN, 1985).

O mecanismo pelo qual o HSV-1 infecta o SNC para causar a encefalite não foi definitivamente estabelecido. A predileção do HSV-1 pela superfície orbital do lobo frontal e a superfície medial do lobo temporal indicam que o vírus pode se espalhar da mucosa olfatória, por meio da placa cribiforme do osso etmoide para

dentro da fossa anterior. Os vírus latentes no gânglio trigêmeo também podem se reativar e se espalhar via nervos sensoriais que inervam as meninges das fossas craniais anteriores e médias (GILDEN *et al.*, 2007). A identificação do HSV na mucosa olfatória de pacientes com encefalite por HSV sugere que a encefalite possa ser uma complicação da infecção da mucosa olfatória (TWOMEY *et al.*, 1979).

Damasio e Hoesen (1985) defendem que a encefalite por HSV seja consequência de uma especial afinidade do vírus pelo córtex límbico adulto. Esse comportamento não se manifesta nos córtex filogeneticamente novos (isocórtex), aos quais o vírus também tem acesso, mas tende a não destruí-los. A rota de entrada pode ser, segundo os autores, de importância secundária e não o principal motivo para o desenvolvimento patológico nesses locais, embora pareça que a rota neural trigêmea seja a mais plausível.

Segundo Livorsi *et al.* (2010), encefalite por HSV pode, ocasionalmente, afetar o tronco encefálico evoluindo para quadriplegia. HSV-1 é o agente etiológico em 79% dos casos reportados e HSV-2 representou 21% dos casos. Infecções podem ser limitadas ao tronco encefálico em 29% dos casos ou multifocais, incluindo o tronco encefálico em 71%. Manifestações comuns incluem achados neuro-oftalmológicos (81%), *deficit* de nervos cranianos (69%) e febre (69%). A taxa de mortalidade é de 41%.

Diferenças no curso clínico dos pacientes com encefalite por HSV-2 são raras quando comparadas com encefalite por HSV-1 (AURELIUS *et al.*, 1993). Normalmente, as encefalites causadas por HSV-1 e HSV-2 não são acompanhadas por lesões herpéticas aparentes (úlceras ou vesículas) na pele ou nas membranas mucosas (AURELIUS *et al.*, 1993).

As meninges não são os únicos componentes do SNC envolvidos na infecção do HSV-2. Praticamente qualquer parte do neuroeixo pode ser comprometido por esse vírus, incluindo a retina, o cérebro, o tronco cerebral, nervos craniais, a medula espinhal e raízes dos nervos (BERGER; HOUFF, 2008).

2.3.2 VZV

Após a varicela ou o herpes zoster, o VZV normalmente permanece nos gânglios da raiz dorsal. Às vezes, após reativação em imunocompetentes ou, sobretudo, em pacientes imunocomprometidos, o vírus se propaga para a medula espinhal e cérebro. Pacientes gravemente imunocomprometidos têm as complicações mais graves durante as reativações, maior profundidade de penetração nos tecidos e maiores quantidades de vírus recuperáveis (GILDEN *et al.*, 2000).

As manifestações do VZV no SNC variam de meningites a encefalites graves e apenas 1,1% apresentam erupções cutâneas (BERGSTROM, 1996). Puchhammer-Stöckl *et al.* (1991) encontraram DNA viral pela metodologia de PCR no LCR de crianças com cerebelite após varicela, sugerindo uma relação entre o quadro clínico e a presença do VZV no SNC.

VZV é diagnosticado em 26% das crianças com ataxia cerebelar aguda (CONNOLLY *et al.*, 1994). Em pacientes imunocompetentes, mielite pode ser uma complicação da varicela aguda ou herpes zoster, normalmente uma ou duas semanas após o desenvolvimento de erupção cutânea. Suas características clínicas são paraparesia com deficiência sensorial e esfinteriana. Imagem por ressonância magnética revela lesões hiperintensas, às vezes com edema focal da medula espinhal. A condição da maioria dos pacientes melhora substancialmente, mas alguns têm rigidez e fraqueza persistente das pernas. Devido à maioria dos pacientes sobreviverem, a patologia dessa forma de mielite transversa é desconhecida (GILDEN *et al.*, 2000).

Shope (1982) realizou uma avaliação retrospectiva de envolvimento hepático e do SNC, associados com casos de varicela em crianças, e revelou que 48,2% dos pacientes tiveram evidências bioquímicas, mas não inflamatórias, de envolvimento do fígado. Outros 31% tiveram anormalidades bioquímicas no fígado junto com encefalopatia não inflamatória (síndrome de Reye), e 20,7% tiveram evidência clara de envolvimento inflamatório do SNC (encefalite). Não houve casos de envolvimento inflamatório hepático isoladamente. As evidências revisadas sugeriram que a patogênese da hepatopatia e encefalopatia hepática (síndrome de Reye) não seja causada por replicação do vírus nos órgãos envolvidos, mas mediada por um mecanismo citotóxico. Além disso, que a doença cerebral inflamatória também não

seja causada por replicação viral no tecido cerebral, mas aparenta ser dano tecidual associado com resposta imune celular (encefalite pós-infecciosa). O conceito colocado neste trabalho é que o vírus, se replicando em um órgão como a pele, possa afetar a função macromolecular de células em outros órgãos (fígado e cérebro), levando a hepatopatia e hepatoencefalopatia.

Após o herpes zoster, o VZV pode se espalhar pelos vasos sanguíneos do cérebro, produzindo uma vasculopatia unifocal ou multifocal, o que ocorre devido à infecção com vírus ativos. A vasculopatia unifocal, antigamente chamada arterite granulomatosa, predomina em adultos idosos imunocompetentes e é caracterizada por um *deficit* agudo focal, que se desenvolve de semanas a meses após um herpes zoster de distribuição trigeminal contralateral (GILDEN; COHRS; MAHALINGAM, 2005).

A vasculopatia VZV multifocal, mais frequentemente observada em indivíduos imunocomprometidos, normalmente apresenta-se com cefaleia, febre, alterações do estado mental e *deficit* focal. O exame de ressonância magnética revela um infarto em um único território vascular na vasculopatia unifocal, enquanto que na vasculopatia multifocal, infartos isquêmicos e hemorrágicos são vistos no córtex e em áreas subcorticais. A angiografia cerebral revela estenose arterial focal. Mudanças patológicas nas artérias afetadas incluem células gigantes multinucleadas, corpos de inclusão denominados *Cowdry A* e partículas de herpesvírus, análises virológicas revelam DNA e antígenos de VZV nos vasos afetados (GILDEN; COHRS; MAHALINGAM, 2005).

2.3.3 EBV

Infecções por EBV podem se apresentar atipicamente e têm sido associadas a uma infinidade de doenças neurológicas. Por tal motivo, esse agente deve ser considerado em todas as doenças neurológicas agudas de etiologia desconhecida na população pediátrica. Os sintomas neurológicos diversos têm sido atribuídos à invasão viral direta, complexos imunes e a reações inflamatórias (CONNELLY; DEWITT, 1994).

O EBV pode causar meningite linfocitária, encefalite, mielite, radiculite, cerebelite e neurite (KAJI; SHOJI, 1995; TSELIS *et al.*, 1997; LANDGREN *et al.*,

1994; GILDEN *et al.*, 2007). EBV pode mediar uma encefalopatia desmielinizante pós-infecciosa caracterizada por anormalidades comportamentais e convulsões (PASKAVITZ *et al.*, 1995). Reativações clínicas significantes não são características comuns, exceto em ambientes de transplantes (GILDEN *et al.*, 2007).

Estudo realizado por Shian e Chi (1996) indica que a encefalite e a encefalomielite por EBV tenham uma ampla variação de achados clínicos e na ressonância magnética. Consciência alterada, convulsões, alucinações visuais e reação psicótica aguda são apresentações comuns. As lesões observadas na ressonância magnética podem desaparecer em um curto período de tempo.

Dores radiculares podem ser evidentes em casos de meningites por EBV (VOLPI, 2004). Deficiências neurológicas transitórias após a encefalite por EBV são frequentes (BHATTI *et al.*, 1990).

Encefalites e meningites são complicações neurológicas comuns associadas com a mononucleose infecciosa (VOLPI, 2004). Há relatos de pacientes com meningite asséptica apresentando sintomas similares aos da mononucleose infecciosa, em que o genoma do EBV foi detectado em leucócitos periféricos e no LCR por PCR.

Contudo, achados laboratoriais e sinais e sintomas clássicos na mononucleose infecciosa podem ser ausentes na encefalite por EBV. Manifestações agudas são diversas e incluem agitação psicomotora (55%), convulsões (36%), cefaleia (36%) e sinais de localização neurológica (27%). Faringite, adenopatia, testes de anticorpos heterófilos ou linfocitose atípica são encontrados em 18%. Estudos de neuroimagens anormais são descritos em 18% dos pacientes e eletroencefalogramas anormais no quadro agudo em 64%. Anormalidades neurológicas persistentes são presentes em 40%, incluindo comprometimento global, comportamento autístico e paresia de extremidade superior esquerda persistente. Sequelas neurológicas ocorrem em um substancial número de pacientes (DOMACHOWSKE *et al.*, 1996).

Antinori *et al.* (1999) realizaram PCR para detecção de DNA de EBV em pacientes infectados com HIV com lesões cerebrais focais. Entre os pacientes, 42% apresentavam linfoma primário no SNC relacionados à AIDS e 58% transtornos não tumorais. O PCR foi positivo em 84,6% dos pacientes com linfoma primário no SNC e foi negativo em todos os pacientes não neoplásicos. DNA de EBV positivo, neste

estudo, apresentou 100% de especificidade e 100% de valor preditivo positivo para o diagnóstico de linfoma primário do SNC.

2.3.4 CMV

Em pacientes imunocompetentes com infecções por CMV, a segunda região mais afetada é o sistema nervoso central (19%), sendo os sintomas: febre, calafrios, fadiga, mialgia, deficiência motora (fraqueza localizada, paraplegia), anormalidades sensoriais (hipoestesia, parestesia, disestesia e anestesia), alteração do nível de consciência, amaurose unilateral e bilateral, retenção urinária ou coma (RAFAILIDIS *et al.*, 2008). DNA de CMV pode ser detectado no LCR de 60% das crianças com infecções congênitas sintomáticas pelo CMV (ATKINS *et al.*, 1994).

A encefalite por CMV é a principal patologia causada pelo CMV do SNC em pessoas com AIDS, com contagem de CD4+ menor que 50 células/mm³. O prognóstico é ruim, com morte que se segue dentro de algumas semanas do diagnóstico em pacientes não tratados (GRIFFITHS, 2004).

Infecções por CMV em pacientes com AIDS também podem causar mielites, retinites e poliradiculopatia (GILDEN *et al.*, 2007). Em pacientes com AIDS, a viremia de CMV geralmente se manifesta em retinite – 85% (DEAYTON; GRIFFITHS, 2000). Imagens por ressonância magnética podem revelar aumento no epêndima ventricular. Doenças focais como vasculite ou desmielinização também foram atribuídas ao CMV. Inclusões citomegálicas, ou seja, uma célula aumentada contendo denso corpúsculo de inclusão intracelular basófilo central em “olho de coruja”, e antígenos CMV específicos foram encontrados em tecido cerebral e vasos sanguíneos de pacientes com AIDS com encefalopatia subaguda. Contudo, é difícil atribuir sinais e sintomas específicos ao CMV (GILDEN *et al.*, 2007).

Fiala *et al.* (1993) realizaram um estudo longitudinal para verificar a patogenia exercida pelo HIV e CMV em pacientes com encefalopatia por AIDS. Complexo AIDS demência típico foi encontrado em 30% dos pacientes (inicialmente, sem retinite e com anormalidades cognitivas, motoras e comportamentais lentamente progressivas, que foram responsivas a zidovudine e células CD4+T relativamente preservadas) e 70% apresentaram complexo AIDS demência complicado por encefalopatia por CMV (com retinite por CMV, neuropatia periférica, *sensorium* alterado e rápido declínio clínico e imunológico). Enquanto que apenas

anticorpos de HIV estavam elevados no LCR de pacientes com complexo AIDS demência, ambas as infecções virais estavam ativas no SNC de pacientes com complexo AIDS demência complicada por encefalopatia por CMV.

2.3.5 HHV-6

O HHV-6 está associado com o desenvolvimento de complicações neurológicas em vários grupos de pacientes, incluindo pacientes submetidos a transplante de medula óssea, receptores de transplante de fígado e hospedeiros imunocompetentes de todas as idades. Essas manifestações incluem convulsões febris e encefalites. O HHV-6 tem sido associado com o desenvolvimento de várias outras complicações neurológicas, incluindo a esclerose múltipla, a paralisia de Bell, surdez súbita, mielite transversa, mielite crônica, paralisia facial periférica, epilepsia mioclônica benigna da infância, polirradiculoneuropatia inflamatória aguda (síndrome de Guillain-Barré) e encefalomielite disseminada aguda (YOSHIKAWA; ASANO, 2000; DEWHURST, 2004).

As manifestações do SNC em pacientes com exantema súbito foram reconhecidas muito antes de a etiologia viral ser definitivamente comprovada. Sinais e sintomas incluem abaulamento de fontanela, irritabilidade, meningoencefalites e encefalopatia residual (BERENBERG; WRIGHT; JANEWAY, 1949; POSSON, 1949; MOLLER, 1956; BURNSTINE; PAINE, 1959; KIMBERLIN; WHITLEY, 1998).

Suga *et al.* (1993) estudaram crianças que tiveram exantema súbito confirmado por estudos virológicos e complicações neurológicas para elucidar as características clínicas, achados laboratoriais, virológicos e sua evolução. Crises convulsivas generalizadas e focais ocorreram durante o estágio pré-eruptivo do exantema súbito. Crianças com encefalite (19%) tiveram características clínicas mais graves. Todas as crianças, exceto aquelas com encefalite/encefalopatia, se recuperaram sem qualquer sequela. Desenvolveram epilepsia 4,7% dos pacientes com encefalite. DNA de HHV-6 amplificado por *nested* PCR foi detectado no LCR de 28,5%. Esses achados sugerem que complicações no SNC, incluindo encefalite, ocorrem no estágio pré-eruptivo do exantema súbito, que o HHV-6 invade o SNC em alguns pacientes e que a evolução nem sempre é benigna.

Mccullers, Lakeman e Whitley (1995) identificaram DNA de HHV-6B por PCR no LCR de 7% de 138 pacientes com evidências clínicas ou laboratoriais de encefalite. Nenhum outro agente etiológico para a doença foi encontrado nesses pacientes. De nove pacientes positivos, 55% tinham menos de 18 anos de idade. Dos pacientes positivos, 44% tinham estudos de neuroimagem anormais, sendo que 22% deles demonstraram lesões focais (lobo parietal e fronto-temporal). Eletroencefalogramas anormais foram encontrados em 87% dos pacientes. Recuperaram-se completamente 44%; 33% tiveram comprometimento neurológico leve a moderado; um paciente teve convulsões focais graves persistentes; e um morreu devido a complicações de sua doença neurológica.

2.3.6 HHV-7 e HHV-8

Existem poucos relatos na literatura de doenças no SNC relacionadas ao HHV-7. Encefalite e paralisia flácida podem ocorrer em adulto imunocompetente em infecções primárias por HHV-7, com invasão do sistema nervoso central e periférico. Casos de infecção primária com sérios sintomas são raros (WARD *et al.*, 2002a).

Em crianças com sinais e sintomas neurológicos suspeitos de meningites, 90,7% possuem anticorpos contra HHV-7 no soro. DNA de HHV-7 foi detectado no LCR de 14% desses pacientes e em células mononucleares do sangue periférico de 65%. Raramente, ou seja, em 2,3%, o DNA HHV-7 é encontrado no LCR e não está presente no soro (YOSHIKAWA *et al.*, 2000).

Exantema súbito causado pelo HHV-7 pode ocorrer associado com hemiplegia aguda na infância (TORIGOE *et al.*, 1996; VAN DEN BERG *et al.*, 1999).

Encefalite fatal associada com infecção por HHV-7 pode ocorrer em criança com leucemia linfoblástica aguda. Há relato de foco microscópico múltiplo de hemorragia associada com degeneração neuronal revelada no tronco cerebral, com detecção de DNA de HHV-7 no LCR e amostra de tecido do tronco cerebral (CHAN *et al.*, 2002).

HHV-8 deve ser considerado no diagnóstico diferencial de encefalites virais cuja causa não foi definida (SAID *et al.*, 1997). Estudos confirmam a infecção do SNC pelo HHV-8 através da investigação pela PCR. DNA de HHV-8 foi detectado

por *nested* PCR no LCR de 2/115 (1,7%) dos pacientes HIV positivos com suspeitas de doenças no SNC.

2.4 NEUROPATOLOGIA

2.4.1 HSV-1 e HSV-2

Alterações anátomo-patológicas na encefalite por HSV-1 incluem inflamação localizada, necrose hemorrágica e formação de corpos de inclusões (GILDEN *et al.*, 2007). Embora encontrada em aproximadamente apenas 50% dos pacientes, a presença de inclusões intranucleares confirmam o diagnóstico de infecção por HSV, e essas inclusões, na maioria das vezes, são visíveis na primeira semana de infecção. Inclusões intranucleares (inclusões *Cowdry* tipo A) são caracterizadas por uma aparência eosinofílica homogênea, sendo frequentemente cercadas por uma área não corada contendo um aro de cromatina. Comprometimentos dos oligodendrócitos e gliose (assim como astrocitose) são achados comuns na encefalite, mas essas alterações acontecem tardiamente (WHITLEY, 2006).

Smith, Lennette e Reames (1941) foram os primeiros pesquisadores a relatarem um caso de encefalite com corpos de inclusão intranucleares compatíveis com infecção causada por HSV, encontrados em lesões cerebrais nas quais o vírus havia sido isolado. Zarafonitis *et al.* (1944) também isolaram o HSV do cérebro de um paciente que sofreu um caso fatal de encefalite aguda. Corpos de inclusão acidófilos intranucleares estavam presentes nas células afetadas do paciente e também foram reproduzidos em animais experimentais. Esse foi o segundo caso de encefalite associada a esses corpos de inclusão, contudo, o primeiro relatado em um adulto, em que uma correlação etiológica foi estabelecida com vírus isolado. Os achados patológicos mais relevantes estavam localizados no lobo temporal esquerdo, no qual linfócitos e numerosas pequenas hemorragias foram encontradas. Essa localização no lobo temporal foi determinada, posteriormente, como característica de encefalite por HSV em indivíduos com mais de três meses de idade.

Kapur *et al.* (1994) realizaram o primeiro registro abrangente do perfil de tecido patológico *in vivo* em um grupo de pacientes com diagnóstico de encefalite HSV, que apresentaram dificuldades de memória como principal sequela. Utilizando um protocolo de ressonância magnética que incluiu imagens de alta resolução de áreas do lobo temporal e do sistema límbico, foram obtidos dados de estruturas relacionadas com a amnésia. As principais características do perfil das lesões foram: (1) dano unilateral ou bilateral do hipocampo, frequentemente acompanhado por danos na região para-hipocampal, amígdala, giro e polos temporais; (2) comprometimento da ínsula; (3) dano no lobo temporal neocortical unilateral, geralmente não ocorre isoladamente e invariavelmente também associado com lesões mediais; (4) danos nos giros temporais anterior e inferior foram mais frequentes e graves que os giros temporais posterior e superior; (5) houve evidência de anormalidade significativa no fórnix; (6) corpos mamilares; (7) núcleos talâmicos unilaterais são afetados em 50% dos casos; (8) menos frequente, lobo frontal, áreas mediais e áreas dorsolaterais; (9) estriato unilateral; (10) giro cingulado, lobos parietal e occipital; (11) análises de covariância das lesões indicaram uma relação próxima entre a presença de anormalidades no lobo temporal e regiões límbicas-diencefálicas.

Nesse mesmo estudo, deficiências neuropsicológicas a longo prazo foram caracterizadas por amnésia densa em 60% dos casos e, menos severo, mas notável, prejuízo de memória anterógrada nos demais. *Deficit* de nomeação e resolução de problemas foram encontrados em poucos casos. Apenas dois pacientes foram capazes de retornar ao emprego. A gravidade da amnésia mostrou uma relação significativa com a gravidade do dano nas estruturas do sistema límbico medial como o hipocampo, com dano bilateral sendo particularmente importante. Porém, houve uma relação mínima entre a perda de memória e a severidade do dano no tálamo, nas áreas dos lobos temporais laterais ou dos lobos frontais (KAPUR *et al.*, 1994).

Bastian *et al.* (1972) isolaram HSV do gânglio trigêmeo obtido em autópsia de 4,5% dos pacientes sem evidências clínicas de doença herpética ativa, e de um paciente com linfoma maligno que morreu com herpes zoster no abdômen, doença de inclusão citomegálica pulmonar e possível HSV oral. Essas observações apoiam o conceito de que infecções latentes nos gânglios sensoriais possam ser a fonte do vírus na doença herpética recorrente no homem.

De acordo com Bustos e Atherton (2002), 68% dos gânglios trigêmeos e 66,6% dos gânglios ciliares, obtidos de cadáveres que não apresentavam infecções ativas de HSV no momento de suas mortes, foram positivos para a presença de DNA do HSV-1 por PCR. Uma frequência de HSV-1 no gânglio ciliar próxima com a do gânglio trigêmeo sugere que esse possa ser um local de latência adicional em humanos. Infecções ativas ou reativação do HSV-1 a partir de locais fora do gânglio trigêmeo podem explicar porque esse vírus é apto a infectar locais, como a retina, que não possuem conexões diretas com o gânglio trigêmeo.

2.4.2 VZV

Existem evidências de que a vasculopatia após herpes zoster oftálmica resulta de invasão direta das paredes dos vasos. DNA de VZV foi detectado durante autópsia em extratos de vasos nos quais foi observado endarterite focal nas artérias cerebral anterior, cerebral média e seus ramos e comunicante posterior (MELANSON *et al.*, 1996).

Sequências de DNA viral de VZV latente foram detectadas em 87% dos que tiveram gânglio trigêmio examinados e em 53% daqueles que tiveram o gânglio torácico examinados em análises *post mortem*, em indivíduos que não haviam apresentado varicela ou herpes zoster nos períodos próximos ao exame. Esses achados indicaram que, após a infecção primária com VZV, o vírus se torna latente em muitos gânglios e que mais de uma região do genoma viral está presente durante a latência (MAHALINGAM *et al.*, 1990).

Morgello *et al.* (1988) descreveram pacientes com leucoencefalite por VZV e AIDS. Os pacientes não tiveram VZV cutâneo ou disseminado nos seis meses de vida prévios. Lesões desmielinizadas semelhantes às de leucoencefalite multifocal progressiva foram vistas nos seus cérebros na autópsia. Numerosas células com inclusões intranucleares tipo Cowdry A circundavam as lesões. Vasos leptomeníngeos acompanhando as lesões mostraram vasculopatia por VZV em um dos pacientes. Infecções vasculares e parenquimais do SNC com VZV sem lesões cutâneas são raras e, segundo os autores, a presença de ambas as patologias em um mesmo paciente não havia sido descrita anteriormente.

2.4.3 EBV

Pedneault, Katz e Miller (1992) avaliaram a presença de genomas de EBV em materiais de biópsia cerebral utilizando a PCR. DNA de EBV foi encontrado em 75% dos pacientes, nos quais a presença do vírus no cérebro foi suspeita clinicamente ou com base em testes sorológicos. A AIDS estava presente em 25% e 8,3% eram receptores de transplante de rim. Biópsias cerebrais de 16% dos pacientes com encefalites devido a outros herpesvírus e de 4,2% com encefalopatia metabólica foram negativas para DNA de EBV, conforme determinado pela PCR. Esses achados indicaram a necessidade de avaliar a função do EBV em diversas síndromes neurológicas, especialmente aquelas que ocorrem em hospedeiros imunodeficientes.

Anagnostopoulos *et al.* (1995) submeteram amostras de biópsias de tonsilas de pacientes com mononucleose infecciosa (MI) aguda à metodologia da hibridização *in situ* altamente sensível, usando sondas de RNA e oligonucleotídeos para a localização celular e distribuição anatômica de infecções latentes e produtivas de EBV. Eles mostraram que em MI a infecção do EBV é restrita a linfócitos B e T. Os estudos, mostrando infecções latentes e produtivas em células linfoides na superfície do epitélio tonsilar, mas não nas células epiteliais, sugeriram que a infecção do EBV entre indivíduos possa ser predominantemente ou seletivamente mediada pela transferência de linfócitos infectados de pessoa a pessoa, e que o epitélio infectado não tem participação na rota de infecção oral.

MacMahon e Glass (1991) defendem que o EBV pode exercer uma função como marcador tumoral no diagnóstico e na conduta de linfomas primários do SNC relacionados à AIDS. Esses autores estudaram por hibridização *in situ* a presença de transcritos de EBV pequenos não codificadores de proteínas (EBERs), contidos em linfócitos transformados por EBV em 18 casos de linfoma primário do SNC relacionados à AIDS, de uma série de necrópsias consecutivas, juntamente com mais três amostras de seus estudos anteriores. Em cada caso, um forte sinal sobre células tumorais indicaram expressão abundante de transcritos EBV-EBER1. Essa associação de 100% sugere que a patogênese desses linfomas associados à AIDS possa diferir da doença sistêmica, em que apenas 30-50% dos tumores estão associados com o EBV. Uma função patogênica do EBV foi reforçada pela

demonstração da expressão de uma proteína viral (a proteína de membrana latente), implicada como um efector para a linfomagenese associada ao EBV.

2.4.4 CMV

Holland *et al.* (1994) descreveram as características clínicas, radiológicas e laboratoriais da encefalite por CMV em uma análise retrospectiva de 14 casos confirmados por autópsia de encefalite por CMV, e os compararam com um grupo controle de pacientes com AIDS demência sem encefalite por CMV. O CMV foi mais comum entre homens homossexuais e um início subagudo foi mais típico (média de duração da apresentação dos sintomas foi de 3,5 semanas contra 18 semanas nos controles com demência). A mediana de tempo de sobrevivência foi de 4,6 semanas para encefalite por CMV e 28 semanas para controles. PCR de amostras de LCR identificaram genoma de CMV em 33% dos casos de encefalite por CMV. A encefalite por CMV deve ser particularmente suspeita em homens homossexuais apresentando encefalopatia subaguda, que tiveram AIDS por mais de um ano e possuem histórico de infecção por CMV sistêmica. Outras características apoiando o diagnóstico de encefalite por CMV incluem lesões periventriculares, hiponatremia e identificação de genoma de CMV por PCR.

Bylsma *et al.* (1995) examinaram infecções por CMV no cérebro, nervos ópticos e retinas em 47 autópsias consecutivas de pacientes com AIDS. Imuno-histoquímica demonstrou infecção por CMV em 11 (23%) cérebros, 2 (2%) de 94 nervos ópticos e 38 (40%) de 94 retinas. Dez (91%) de 11 pacientes com encefalite por CMV tiveram retinite concomitante. Enquanto 10 (42%) de 24 pacientes com retinite por CMV tiveram encefalite por CMV, quando a retinite incluiu a região peripapilar, 75% tiveram encefalite. Geralmente, o parênquima do nervo óptico não foi infectado, apesar de extensiva retinite peripapilar. Essas associações sugerem que retinite por CMV define um grupo de pacientes com AIDS em risco de desenvolver encefalite por CMV (risco relativo de 9,5%), particularmente quando a retinite envolve a região peripapilar.

2.4.5 HHV-6

Ahtiluoto *et al.* (2000) reportaram o primeiro caso de encefalite aguda, mostrando DNA de HHV-6 em células cerebrais de uma paciente imunocompetente. Tratava-se de uma criança com 23 meses de idade que morreu após dois dias de doença com erupções cutâneas, febre e convulsões, típicas de roséola infantil. Achados neuropatológicos eram consistentes com encefalite viral hemorrágica nas áreas do tegumento pontino e tálamo medial. O DNA do HHV-6 foi encontrado no núcleo pontino por hibridização *in situ*. Também foi encontrado DNA no soro e no tecido pontino por PCR, indicando uma infecção aguda primária.

Cuomo *et al.* (2001) investigaram a presença e a distribuição de variantes do HHV-6 por *nested* PCR em 118 biópsias de pacientes com tumores no tecido nervoso e em 31 amostras de autópsia do cérebro de indivíduos adultos saudáveis, que morreram por causas não relacionadas ao comprometimento do SNC. Sequências de DNA de HHV-6 foram detectadas em tecidos nervosos normais e neoplásicos em uma frequência de 32% e 37%, respectivamente. Em ambos os tecidos, a variante A era três vezes mais frequente que a variante B. Linfócitos de sangue periférico procedentes de sete pacientes afetados por tumores continham a mesma variante que suas respectivas amostras cerebrais, o que foi aferido pela PCR. A expressão de proteínas codificadas precoces imediatas p41 foi detectada por imuno-histoquímica em cérebros neoplásicos, mas não em cérebros normais. Isso pode refletir a reativação viral de vírus latentes em pacientes imunocomprometidos. Dados soroepidemiológicos indicam uma frequência na distribuição de anticorpos anti-HHV-6 em pacientes com tumores cerebrais semelhantes da encontrada em doadores saudáveis.

Em um estudo muito parecido, Chan *et al.* (2001) examinaram a presença de HHV-6 em tecidos cerebrais de quarenta casos consecutivos *post mortem*. Quatro pacientes haviam morrido de hemorragia intracranial, dois resultantes de lesões traumáticas e dois devido à ruptura de aneurismas intracranianos. As causas de morte dos demais 36 pacientes não estavam relacionadas ao SNC e nenhum dos pacientes tinha características clínicas ou patológicas sugestivas de infecções virais como causa das mortes. Para cada caso, amostras de autópsia foram coletadas do cerebelo, lobos frontal, temporal, parietal e occipital de ambos os lados do cérebro. DNA de HHV-6 foi detectado por *nested* PCR e caracterizado nas variantes A e B.

No total, 97 de 400 amostras (24,3%) eram positivas para DNA HHV-6, sendo 16 variantes A e 81 variantes B, mas nenhuma das amostras apresentava ambas as variantes juntas. Quando analisadas por paciente, 34 em 40 (85%) tinham DNA HHV-6 detectados no cérebro. A positividade de DNA não mostrou variação significativa em diferentes sexos e idades. Quatro pacientes possuíam a variante A, 23 a variante B e sete possuíam ambas as variantes em diferentes posições.

Os resultados indicam que ambos o HHV-6A e HHV-6B são neurotrópicos e que o cérebro humano pode ser um local de latência. HHV-6B foi detectado em tecidos cerebrais na maioria da população estudada (75%) e com uma distribuição generalizada no cérebro. Embora a prevalência de HHV-6A no cérebro seja mais baixa (27,5%), tendo em vista a sua menor soroprevalência, o potencial invasivo da variante A pode ser comparável ao da variante B. Os autores concluem que, embora ambas as variantes sejam potenciais patógenos do sistema nervoso central, o fato de que eles possam existir, provavelmente na maior parte do tempo como comensais no cérebro humano, precisa ser considerado ao interpretar seus papéis em neuropatologia (CHAN *et al.*, 2001).

2.4.6 HHV-7

Chan *et al.* (2000) examinaram por *nested* PCR a prevalência e distribuição de HHV-7 em trinta consecutivas análises de tecidos cerebrais *post mortem*. Para cada caso, dez amostras de tecidos foram coletadas do cerebelo, respectivamente, lobos frontal, temporal, parietal e occipital de ambos os hemisférios cerebrais. Três pacientes morreram de hemorragia intracranial, os outros morreram de causas não relacionadas ao SNC. No total, 5% (15/300) das amostras de tecidos cerebrais foram positivas para DNA de HHV-7. As taxas positivas com respeito à posição anatômica foram similares (0-3/30). Quando analisadas por paciente, 36,7% (11/30) foram DNA positivas. Os grupos positivos e negativos não mostraram diferença significativa na distribuição de gênero ou idade. A maioria dos pacientes com DNA viral positivo (81,8%) tinha DNA de HHV-7 detectado em apenas uma posição anatômica; apenas dois pacientes tinham DNA viral detectado simultaneamente em três sítios anatômicos. Esses resultados sugerem que o HHV-7 persiste em tecidos

cerebrais de uma substancial proporção da população adulta e, na maioria dos indivíduos, essa distribuição provavelmente está confinada a um local.

Kempf *et al.* (1998) investigaram infecções do HHV-7 em tecidos humanos histologicamente normais para detecção imuno-histoquímica da fosfoproteína (pp85) codificada pelo gene viral U14. Inesperadamente, células expressando o antígeno estrutural do HHV-7 foram detectadas nos pulmões, na pele e nas glândulas mamárias. Morfologicamente e fenotipicamente elas eram diferentes de linfócitos. O fígado, os rins e as tonsilas eram positivos, embora o número de células tenha sido baixo. O intestino grosso, o baço e o cérebro foram negativos. Esses resultados demonstraram que uma variedade de tecidos abrigam células em uma fase tardia da infecção e sugerem que o HHV-7 cause uma infecção persistente ao invés de uma infecção latente.

2.4.7 HHV-8

Said *et al.* (1997) identificaram sequências de HHV-8 por PCR e pelo método de *southern blot* em biópsias cerebrais de três casos de encefalite não justificadas por outros agentes, dois dos quais eram HIV positivos. Esses foram os primeiros casos descritos de encefalite por HHV-8 em pacientes imunocomprometidos. Lesões características incluíram edema das células endoteliais e infiltração perivascular por linfócitos. Os autores afirmam que HHV-8 deve ser considerado no diagnóstico diferencial de encefalites de causa desconhecida.

O HHV-8 tem um potencial neuroinvasivo e neuropersistente. Em um estudo de Chan *et al.* (2000), em tecidos cerebrais *post mortem* de ambos os lados do cerebelo e lobos frontal, temporal, parietal e occipital, 63,3% dos indivíduos estudados foram positivos e mostraram um significativo aumento da positividade com a idade. PCR para detecção de HHV-8 foi positiva para 14% das amostras, com taxas similares para cada posição. Dos que apresentam DNA de HHV-8, 52,6% abrigavam o DNA viral em mais de uma posição no cérebro.

Para tentar esclarecer o neurotropismo do HHV-6, HHV-7 e HHV-8 *in vivo*, Chan *et al.* (1999) detectaram sequências de DNA viral por *nested* PCR presentes em autópsias de tecidos cerebrais corticais frescos obtidos de 84 indivíduos

chineses consecutivos (idade média de 66,9 anos). Esses pacientes eram, aparentemente, imunocompetentes e sem sinais clínicos de doenças virais. HHV-6 foi detectado em 36 de 84 deles (42,9%). HHV-7 e HHV-8 foram detectados, respectivamente, em 3 e 2 pacientes. As baixas taxas positivas de HHV-7 e HHV-8 podem representar um potencial neuroinvasivo relativamente menor desses vírus. Alternativamente, a localização do HHV-7 e HHV-8 podem ser mais restritas e as amostras de tecidos corticais podem não representar o local mais abundante de persistência no SNC.

Karatas *et al.* (2008) realizaram um estudo para investigar a presença de DNAs virais de HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-8 e CMV no hipocampo de pacientes com síndrome de epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM). Material patológico foi obtido de 33 pacientes com ELTM que sofreram lobectomia temporal com amigdalo-hipocampectomia devido a convulsões intratáveis. Materiais de autópsia do hipocampo de sete pacientes sem doenças neurológicas foram utilizados como controle. Os dados também foram correlacionados com o histórico clínico dos pacientes, incluindo convulsões febris, idade e histórico de infecções no SNC. Foi realizado PCR em tempo real para a detecção do DNA desses vírus. HHV-6, HSV-1 e HHV-8 foram detectados no hipocampo de três, dois e um pacientes com ELTM, respectivamente. Nenhum hipocampo dos pacientes com ELTM foi positivo para DNA de HSV-2 e/ou CMV. Três pacientes com DNA HHV-6 positivo tiveram convulsões febris e histórico familiar de epilepsia. Nenhuma das amostras controle mostrou positividade para os cinco vírus testados. Esse estudo foi o primeiro a relatar a presença de genoma viral de HHV-8 em tecido cerebral de paciente com ELTM. DNAs virais foram detectados em um total de 18% dos pacientes nesse estudo.

Corboy, Garl e Kleinschmidt-DeMasters (1998) realizaram *nested* PCR para identificar HHV-8 usando DNA extraído de amostras de autópsia e biópsia de linfoma cerebral de 36 pacientes com e sem AIDS, para investigar a função do HHV-8 em linfomas primários do SNC e outros linfomas cerebrais. Foi detectado DNA de HHV-8 em 56% de todos os casos de linfoma primário do SNC, com taxas similares para pacientes com e sem AIDS, mas apenas em um de cinco linfomas metastáticos de células B. Tecidos cerebrais histologicamente não comprometidos por linfomas foram negativos para HHV-8, mas em três pacientes em que havia linfoma primário do SNC a pesquisa de HHV-8 foi positiva. Em contraste, os autores demonstraram

DNA HHV-8 em baço e lesões de sarcoma de Kaposi de pacientes com linfoma primário do SNC. Os autores sugerem que linfócitos sistemicamente infectados possam exercer uma função na patogênese do linfoma primário do SNC.

Gomez-Brouchet *et al.* (2001) utilizaram técnicas de imuno-histoquímica para avaliar a infecção por HHV-8 em linfomas de grandes células B no SNC de pacientes com e sem AIDS. O anticorpo LN53, que reage com o antígeno latente nuclear 1 do HHV-8, foi utilizado em tecidos de 35 pacientes (17 com e 18 sem AIDS) com linfomas grandes de células B do SNC. Nenhum dos 35 casos continha células positivas para o antígeno estudado. Esses resultados confirmam a falta de infecção por HHV-8 nessas células tumorais.

Bélec *et al.* (1997) estudaram a presença de HHV-8 por *nested* PCR e a expressão de EBV por imunoquímica e hibridização *in situ* em vinte linfomas imunoblásticos não Hodgkin do SNC de pacientes que morreram de AIDS, e em dez amostras de tecido cerebral de pacientes que morreram de AIDS sem linfoma cerebral ou sarcoma de Kaposi como grupo controle. Seis linfomas (30%) continham sequências de HHV-8 e 19 (95%) expressaram EBV. A detecção de HHV-8 foi mais frequente em pacientes com sarcoma de Kaposi do que em outros indivíduos (4/6 contra 2/14). Três controles (30%) continham sequências de HHV-8, enquanto nenhum expressou EBV. Linfomas imunoblásticos não Hodgkin do SNC relacionados à AIDS estão, portanto, claramente associados com a expressão de EBV, enquanto a presença de HHV-8 aparece ocasionalmente e geralmente associada com baixa carga viral. A alta frequência de HHV-8 em pacientes com linfomas imunoblásticos não Hodgkin do SNC relacionados à AIDS com sarcoma de Kaposi sugere que esse vírus possa exercer uma função na patogênese de alguns linfomas cerebrais.

Opsahl e Kennedy (2006) investigaram o possível envolvimento do HHV-7 e HHV-8 na esclerose múltipla, utilizando técnicas de hibridização fluorescente *in situ* em tecidos *post mortem*. Foi avaliada a presença de genes virais ou expressão de proteínas virais em pacientes com esclerose múltipla com substância branca aparentemente normal, tecido com lesão e amostras controles. Proteínas ou RNA mensageiro de HHV-7 e HHV-8 foram detectadas em alguns indivíduos das três categorias de amostras e foram limitados a oligodendrócitos. Os autores concluíram que há pouca evidência em suas amostras sugestivas de envolvimento desses vírus na esclerose múltipla.

2.5 LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Várias alterações bioquímicas e celulares no LCR são observadas em infecções por herpesvírus no SNC, no entanto, por não serem específicas, elas não podem ser utilizadas como fatores diagnósticos. Não obstante, qualquer alteração deve aumentar o índice de suspeita de diagnóstico para uma infecção do SNC (BOIVIN, 2004).

Nas encefalites virais, a pressão de abertura do LCR é levemente aumentada e ocorre leve a moderada pleocitose de 5-1000 células/mm³, com predomínio de linfócitos. Contudo, no início da infecção, a contagem de leucócitos pode ser normal ou os neutrófilos podem predominar (CARROL *et al.*, 2006). A contagem de células do LCR pode ser normal ou levemente aumentada, embora na encefalite por HSV-1 possa ser acentuadamente aumentada, o que pode acontecer devido à leucoencefalite hemorrágica necrosante. A taxa de glicose tende a ser normal. A proteína no LCR é, muitas vezes, ligeiramente elevada, ente 50 a 100 mg/dL (OOI *et al.*, 2007; SOLOMON; HART; BEECHING, 2007).

Independentemente do *status* imunológico do paciente, Hanson *et al.* (2007) encontraram contagem de células e concentração de proteínas elevadas em todas as amostras de LCR de indivíduos com encefalites positivas para HSV-1.

Em torno de 97,5% dos pacientes com meningites por HSV-2 apresentam pleocitose no LCR (AURELIUS *et al.*, 2002). No entanto, em pacientes imunocomprometidos com meningites por HSV-2, a contagem de leucócitos geralmente é inferior a 400 células/mm³, com uma mediana de 74 células/mm³ e uma elevada concentração de proteína (72 mg/dL). Metade dos casos apresenta uma baixa concentração de glicose no LCR (50% da concentração plasmática) (MOMMÉJA-MARIN *et al.*, 2003).

Chesky *et al.* (2000) identificaram DNA de HSV no LCR por *nested* PCR em cinco pacientes imunocompetentes que apresentavam encefalites e em dois pacientes com HIV, também com encefalites. Nos pacientes imunocompetentes, a mediana de leucócitos foi de 235 células/mm³, variando de 45 a 900 células/mm³; a porcentagem de linfócitos teve uma mediana de 98%, variando de 78 a 100%; a mediana de quantidade de proteína foi de 158 mg/dL, variando de 75 a 334 mg/dL; e a glicose teve mediana de 56 mg/dL, variando de 50 a 65 mg/dL. Nos pacientes

imunocomprometidos, a contagem de leucócitos foi elevada em ambos, com predomínio de linfócitos, proteína elevada e glicose com 39 mg/dL e 71 mg/dL.

Pacientes com AIDS, apresentando vasculopatia causada por VZV, podem apresentar proteína elevada no LCR sem pleocitose (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; AMLIE-LEFOND; GILDEN, 1996).

A maioria dos pacientes com arterite granulomatosa causada pelo VZV têm pleocitose (com menos de 100 células/mm³, com predomínio de células mononucleares) (GILDEN *et al.*, 2000). No estudo de Shope (1982), a pleocitose foi observada em 70% dos pacientes com comprometimento encefálico durante a varicela.

Na rombencefalite causada por VZV (inflamação do rombencéfalo, estrutura que compreende o bulbo raquidiano, protuberância anular e o cerebelo, que delimitam uma área rombóide formada pelo quarto ventrículo e a cavidade endimária), o LCR pode estar normal, embora uma moderada pleocitose e aumento na concentração de proteína possam ocorrer em até 25% dos pacientes (GILDEN, 2004).

Em casos de meningite por EBV, a pressão do LCR é muitas vezes elevada e também com leve aumento da concentração de proteínas (geralmente < 200 mg/dL). Mesmo na ausência de sintomas neurológicos, anormalidades no LCR são comuns em pacientes com mononucleose infecciosa sintomática (VOLPI, 2004).

As alterações no LCR são variáveis em casos de encefalites causadas pelo EBV. A pressão de abertura pode ser normal ou levemente elevada. Há uma pleocitose mononuclear com contagem abaixo de 22 células/mm³. Níveis de glicose são normais e de proteína são normais ou pouco elevados (CONNELLY; DEWITT, 1994).

Domachowske *et al.* (1996) estudaram casos de encefalites e meningites causadas por EBV em pacientes com menos de 18 anos de idade, em que 50% das amostras de LCR mostraram pleocitose e 36% tinham concentrações elevadas de proteína (> 40 mg/dL).

Fisher, Shenker e Nussbaum (1980) relataram pacientes adolescentes que tiveram complicações neurológicas da mononucleose infecciosa, incluindo encefalopatia, ataxia cerebelar e meningoencefalopatia. Apresentavam LCR normal 44%, valores aumentados de proteína 44% (> 51mg/dL) e 33% apresentavam leucocitose (> 8 células/mm³).

Rojanawiwat *et al.* (2005) diagnosticaram EBV em 31 pacientes com AIDS e suspeita clínica de infecção no SNC. A contagem de células no LCR foi elevada (mediana de 8 células/ μ L; intervalo interquartil 0-66) e a concentração de proteína também (mediana de 80 mg/dL e intervalo interquartil de 55-160).

No estudo de Arribas *et al.* (1996), pacientes imunocompetentes com encefalites por CMV (n = 11) apresentaram uma mediana de contagem de leucócitos de 49 células/mm³ (variando entre 1 a 584 células/mm³, sendo a maioria dos leucócitos linfócitos), nível de glicose de 3,4 mmol/l (variando de 2,6 a 4,7 mmol/l) em quatro pacientes e relatado como normal em seis pacientes, nível de proteína 79 mg/dL (variando de 22 a 125 mg/dL) em dez pacientes.

Arribas *et al.* (1996) levantaram dados de pacientes com HIV em estágio avançado, diagnosticados com ventriculoencefalite e/ou radiculomielite por CMV (n = 19). A mediana de contagem de leucócitos e concentração de proteína são menores em pacientes com ventriculoencefalite isolada (contagem de leucócitos de 4 células/mm³ e nível de proteína de 122 mg/dL) do que naqueles com radiculomielite coexistente (contagem de leucócito de 520 células/mm³ e nível de proteína de 470mg/dL). A pleocitose em pacientes com radiculomielite é predominantemente polimorfonuclear (mediana 70%); e em pacientes com ventriculoencefalite isolada é predominantemente mononuclear (mediana 8% polimorfonuclear).

Silva *et al.* (2010) diagnosticaram DNA de CMV no LCR pela PCR *end-point* de única etapa em 13 pacientes com AIDS que apresentavam encefalites, polirradiculopatia, encefalite focal e ventriculoencefalite. A mediana da contagem total de leucócitos no LCR foi 3 células/mm³ (variando de 1-3150 células/mm³), a mediana de glicose foi de 50 mg/dL (variando de 10-89 mg/dL) e a mediana de proteína foi de 113 mg/dL (variando de 25 a 914 mg/dL). LCR com características bioquímicas e celulares normais foram observadas em apenas um caso positivo (8%).

Wang *et al.* (1999) analisaram 22 casos de pacientes que sofreram transplante de medula óssea alogênico que apresentavam sintomas no SNC e detectou HHV-6 no LCR de 23%. Entre os pacientes com presença do vírus, 20% apresentaram contagem de leucócitos elevada com predomínio de células mononucleares, 80% apresentavam hemáceas no sangue e 80% apresentavam níveis de albumina elevado.

No estudo de McCullers, Lakeman e Whitley (1995), amostras de LCR de 138 pacientes com evidências clínicas ou laboratoriais de encefalites foram testados pela PCR de *end-point* para DNA de HHV-6 e nove (7%) foram positivos. Os valores de celularidade do LCR nos grupos de pacientes positivos e negativos foram similares (pacientes HHV-6 positivos: média de contagem de leucócitos de 81/mm³, média de concentração de proteínas de 57 mg/dL; pacientes HHV-6 negativos: média de contagem de leucócitos de 184 células/mm³ e média de concentração de proteínas de 86 mg/dL).

Yoshikawa *et al.* (2000) estudaram seis crianças com suspeita de menigites que tiveram DNA de HHV-7 detectado no LCR. A contagem de leucócitos foi superior a 6 células/mm³ em 83%, com mediana de 16 células/mm³, variando de 7 a 41 células/mm³.

Pohl-Koppe *et al.* (2001) estudaram crianças com sintomas no SNC relacionados à infecção por HHV-7 e 50% apresentavam leucócitos no LCR acima de 20 células/mm³ e 33% proteína elevada.

Poucos relatos de casos foram publicados sobre presença de HHV-7 no SNC de imunossuprimidos. Há um relato de paciente com HHV-7 detectado no LCR após transplante de medula óssea diagnosticado com meningite, que apresentou pressão de abertura normal de LCR com presença de 12 leucócitos/mm³, predominantemente linfócitos com níveis normais de proteínas (YOSHIKAWA *et al.*, 2003).

2.6 DIAGNÓSTICO DOS HERPESVÍRUS NO SNC

O diagnóstico definitivo de uma infecção viral no SNC baseia-se na demonstração do vírus no SNC. Evidências de menor valor preditivo vêm da detecção do vírus em outros locais em um paciente com uma síndrome no SNC (por exemplo, a partir de *swabs* da garganta, do reto ou de vesículas), ou mostrando uma resposta de anticorpos ao vírus da família *Herpesviridae* no soro. Presume-se, então, que o organismo seja responsável pela apresentação clínica, embora sempre exista a possibilidade de que seja uma infecção coincidente (SOLOMON; HART; BEECHING, 2007).

Antes da análise do LCR pela PCR, a cultura de tecido cerebral obtida por biópsia foi considerada o padrão ouro para o diagnóstico de encefalite por HSV (BOIVIN, 2004). Com o advento da PCR, a biópsia cerebral de pacientes com suspeita de encefalite tornou-se menos comum. Ela pode, ainda, ter uma função em pacientes com piora clínica (SOLOMON; HART; BEECHING, 2007). Outros procedimentos para a detecção do vírus em amostras de tecido incluíram coloração por imunofluorescência/imunoperoxidase, histopatologia e microscopia eletrônica, mas todos menos sensíveis e menos específicos que a cultura viral (BOIVIN, 2004).

A pesquisa de anticorpos continua a desempenhar um papel importante no diagnóstico de muitas infecções virais no SNC. Técnicas tradicionais requerem a demonstração de um aumento de quatro vezes nos anticorpos entre as amostras de soro coletadas na fase aguda e convalescente, com duas a quatro semanas de diferença entre as coletas. Portanto, não são úteis no diagnóstico precoce e, na prática, as amostras convalescentes são muitas vezes esquecidas (SOLOMON; HART; BEECHING, 2007).

Imunoensaios enzimáticos (ELISA) mais recentes podem detectar imunoglobulinas IgM e anticorpos IgG contra a maioria dos vírus importantes no soro e LCR. O IgM antiviral específico é frequentemente produzido dentro de poucos dias de uma infecção primária e pode ser detectado por diversos ensaios. A detecção de anticorpos IgM específicos no LCR em títulos maiores que o do soro indica uma produção local de anticorpos no SNC em resposta a uma infecção. IgM normalmente não atravessa a barreira hematoencefálica devido ao seu tamanho. Contudo, se há uma inflamação, a barreira permite a passagem do IgM, assim como de outras imunoglobulinas. Nessas circunstâncias, a relação do LCR ao soro para anticorpos IgM específicos pode ser comparada à taxa de imunoglobulinas como um todo, para decidir se essa é a produção local, em vez de escape por meio da barreira hematoencefálica inflamada. A detecção de IgM não é muito útil para infecções por herpesvírus, que muitas vezes são reativações. Em contraste ao IgM, o IgG é normalmente encontrado no LCR em uma relação de 1/200 da concentração do soro. Portanto, em uma infecção aguda primária, o IgG sobe mais tarde que o IgM tanto no LCR quanto no soro. Em reativações e infecções secundárias, IgG tende a subir mais cedo e em maior extensão que o IgM (SOLOMON; HART; BEECHING, 2007).

2.6.1 Diagnósticos por métodos de biologia molecular

A técnica da PCR pode ser realizada de forma rápida e barata. Os resultados dos testes normalmente estão disponíveis mais rápido que a cultura padrão ou métodos sorológicos. Ácidos nucleicos de vírus podem ser identificados pela análise da PCR de qualquer secreção corporal, fluidos ou tecidos. A disponibilidade generalizada de qualquer teste caseiro, na maioria dos hospitais, ou o pronto acesso a um laboratório de referência fez com que testes de PCR no LCR e fluidos corporais fossem incorporados à prática médica nos EUA e outros países desenvolvidos (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; DEBIASI; TYLER, 2001).

Para evitar a lise celular que liberaria o DNA viral no sobrenadante, o LCR para PCR não deve ser congelado antes de transportado. As amostras devem ser centrifugadas e o *pellet* examinado para o DNA vírus específico. A sensibilidade apurada da técnica implica na necessidade de poucos volumes de LCR para análise (30µL), embora os laboratórios geralmente solicitem pelo menos 0,5 ml (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; DEBIASI; TYLER, 2001). As amostras de LCR colhidas com menos de 3 dias ou mais de 14 dias dentro do processo da doença têm menor probabilidade de serem PCR positivas para os herpesvírus do que as puncionadas entre os dias 3 e 14 (DAVIES *et al.*, 2005).

Atualmente, vários protocolos diagnósticos têm sido descritos, porém, não se observa uma padronização nas metodologias de PCR para pesquisa dos agentes virais nas infecções do sistema nervoso. Para determinar a qualidade de testes de amplificação de ácidos nucleicos de herpes simplex, dois painéis de proficiências de HSV foram produzidos pelo Instituto Sueco para Controle de Doenças Infecciosas, em Slona, Suécia, e distribuídos a vários laboratórios em diferentes países europeus. Cada painel compreendia 12 amostras de LCR em várias concentrações de HSV-1 e HSV-2 inativadas e congeladas ou controles negativos. Sessenta e oito laboratórios participaram na distribuição do painel um, em 1999, e 73 no painel dois, em 2000. Uma alta frequência de resultados falso-positivos e um grande número de resultados falso-negativos encontrados acentuaram a necessidade de melhoria na qualidade da amplificação de HSV e na instituição de programas de controle de qualidade externos (SCHLOSS, 2003).

Apesar da ampla aplicação da PCR no LCR, a análise de PCR em tecidos no SNC permanece essencialmente como uma ferramenta de pesquisa e não está

disponível em todas as instituições. PCR em tecidos e LCR, às vezes em conjunto com a imuno-histoquímica ou técnicas de hibridização *in situ*, têm favorecido o entendimento do papel dos herpesvírus nos casos de encefalites, meningites, meningoencefalites, mielites, ventriculoencefalites, polineuroradiculomielopatias e infecções do tronco cerebral (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; DEBIASI; TYLER, 2001).

A sensibilidade de um teste particular de PCR varia de acordo com a quantidade de amostra processada, a técnica de preparação do DNA, os iniciadores, os tampões e as condições de ciclagem da PCR e, também, se é utilizado um teste de PCR de etapa única ou um *nested* PCR. Em um *nested* PCR, os produtos da primeira amplificação são reamplificados com um segundo par de iniciadores, localizados entre os dois primeiros. Esse processo aumenta a sensibilidade e a especificidade da detecção. A padronização da sensibilidade e especificidade entre diferentes laboratórios é essencial para fornecer dados confiáveis e reprodutíveis (CINQUE *et al.*, 1996). Enquanto a *nested* PCR pode aumentar a sensibilidade da PCR ela também aumenta a probabilidade de reações falso-positivas decorrentes de contaminações. Resultados de estudos utilizando a *nested* PCR podem variar consideravelmente daqueles que utilizam a PCR simples (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; DEBIASI; TYLER, 2001).

Muitas vezes, é difícil determinar com precisão a sensibilidade e especificidade da PCR em infecções no SNC, porque em algumas situações os padrões anteriormente utilizados para o diagnóstico são menos sensíveis que a PCR. Em alguns casos, o diagnóstico definitivo baseava-se em procedimentos invasivos, como a biópsia cerebral, que pode ser executada apenas em pacientes gravemente doentes (DEBIASI; TYLER, 1999).

A sensibilidade e a especificidade da PCR no LCR para encefalites por HSV - 1 ou HSV-2 é superior a 90% na maioria dos estudos para crianças e adultos. Um resultado inicialmente negativo de PCR para HSV em um paciente com alta probabilidade de uma desordem neurológica reduz significativamente o diagnóstico, mas não o exclui (BERGER; HOUFF, 2008).

Aslanzadeh *et al.* (1992) realizaram PCR *end-point* de única etapa e *nested* PCR prospectivamente no LCR de 51 pacientes com suspeita de infecção por HSV e em vinte controles sem doenças no SNC. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram flanqueadores de um segmento de 92 pb do gene da DNA polimerase do

HSV. Os produtos amplificados foram submetidos a *Southern blot*. A revisão dos prontuários médicos revelou 15 pacientes com infecção no SNC e, desses, três continham DNA de HSV detectados no LCR (dois por PCR *end-point* de única etapa e um por nested PCR). As técnicas de PCR revelaram uma especificidade de 100%.

Aurelius e Johansson (1991) realizaram *Southern blotting* para confirmar a especificidade da amplificação de um teste de PCR desenvolvido com dois pares de iniciadores *nested* para a amplificação de DNA de HSV no LCR. O teste foi aplicado em amostras de LCR de 43 pacientes consecutivos com encefalite por HSV verificada pela presença do antígeno viral em biópsia cerebral ou necrópsia e pela produção intratecal de anticorpos ao HSV. PCR detectou DNA de HSV em 97% dos pacientes com encefalite comprovada por HSV. Todos, exceto um, foram positivos na primeira amostra de LCR coletada. O primeiro paciente PCR negativo tinha sido tratado com Aciclovir por vinte horas após o início dos sintomas. Todos os controles foram PCR negativos, assim como os controles internos de contaminação. O resultado do PCR permaneceu positivo em amostras testadas 27 dias após o início dos sintomas neurológicos.

Lakeman e Whitley (1995) analisaram amostras LCR de pacientes com indicação clínica de encefalite por HSV que foram submetidos a biópsia cerebral diagnóstica. DNA de HSV foi detectado por PCR *end-point* de única etapa com a utilização de dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores. Um par de iniciadores tinha como alvo uma região de 179 pb do gene da DNA polimerase e o segundo par tinha como alvo uma região de 149 pb do gene da glicoproteína B. Amostras de LCR de pacientes com biópsia positiva e negativa foram avaliados com ambos os pares de iniciadores. DNA de HSV foi detectado em 53 de 54 pacientes (98%) com encefalite por HSV, comprovada por biópsia cerebral, e foi detectado em todas as 18 amostras de LCR obtidas antes da biópsia cerebral de pacientes com encefalites comprovadas por HSV. Quatro de 19 amostras de LCR foram positivas após duas semanas de terapia antiviral. Resultados positivos foram encontrados em 3 (6%) dos 47 pacientes em que cultura de tecido cerebral foi negativa. A metodologia de PCR *end-point* de única etapa apresentou uma sensibilidade de 98%, uma especificidade de 94%, um valor preditivo positivo de 95% e um valor preditivo negativo de 98%.

Aurelius *et al.* (1993) encontraram resultados em completa concordância entre a sorologia intratecal de HSV-2 e a detecção de DNA de HSV-2 por PCR no LCR. Puchhammer-Stöckl *et al.* (2001) avaliaram a confiabilidade de uma

metodologia de PCR *end-point* de única etapa para a detecção de HSV em amostras de LCR, examinando retrospectivamente o quadro clínico de um grande número de pacientes com sintomas no SNC testados rotineiramente. Foram utilizados iniciadores que se anelavam na parte UL 42 do genoma do HSV-1. HSV foi detectado em 0,8% (12/1427) das amostras. Uma análise retrospectiva do curso da doença, que foi possível em 799 pacientes PCR negativos, levou à identificação de três casos adicionais em que a encefalite por HSV ocorreu apesar dos resultados negativos da PCR. Uma alta especificidade do teste foi demonstrada pela falta de resultados falso-positivos nos demais 708 casos em que outros agentes etiológicos causadores dos sintomas no SNC foram identificados durante o acompanhamento clínico.

Rowley *et al.* (1990) analisaram LCR de quatro pacientes com encefalites por HSV comprovada por biópsia cerebral, ou por autópsia, e de seis controles que tinham outras infecções do SNC ou lupus eritematoso sistêmico. Foi utilizada a PCR *end-point* de única etapa com par de iniciadores derivados de uma região altamente conservada do gene da DNA polimerase. Todas as quatro amostras de pacientes com encefalites foram positivas pela PCR, enquanto amostras de LCR dos seis pacientes controles foram negativas.

Bergström (1996) realizou um estudo prospectivo usando *nested* PCR em amostras de LCR e de tecido cerebral de 260 pacientes com indicação clínica para detecção de DNA de VZV, usando um par de iniciadores internos que se anelavam à região única XbaI M do genoma do vírus. Um grupo controle de 55 amostras de LCR de pacientes com várias condições neurológicas como meningite bacteriana, encefalite e encefalopatia, assim como seis amostras de tecido cerebral de quatro pacientes que morreram de doenças não infecciosas, foram incluídos. Amostras de oito (sete LCRs e um de tecido cerebral) dos 260 pacientes investigados (3,1%) foram positivas para DNA de VZV. Todos os oito tinham reativação de VZV avaliada por testes sorológicos e análises clínicas. Em 18 pacientes, DNAs de outros vírus foram identificados (HSV-1, HSV-2 e EBV) e nesses indivíduos não foi detectado DNA de VZV, indicando uma alta especificidade do teste.

Cinque *et al.* (1993) analisaram amostras de LCR coletadas até 180 dias antes da morte de 85 pacientes com infecção por HIV e transtornos neurológicos. As amostras de LCR foram examinadas retrospectivamente por *nested* PCR para a presença de DNA de EBV. Linfomas primários histologicamente evidentes foram

encontrados em 17 pacientes e o EBV foi demonstrado em tecidos por hibridização *in situ* em 16 de 16 casos examinados. Todos os 17 pacientes com linfoma primário do SNC tinham DNA de EBV no LCR. DNA de EBV foi encontrado no LCR de um de 68 pacientes HIV positivos sem linfoma detectado histologicamente durante a necrópsia. *Nested* PCR para a detecção de DNA de EBV foi 100% sensível e 98,5% específica para linfomas primários associados a AIDS.

Gozlan *et al.* (1992) sugerem que a metodologia de PCR possa ser uma ferramenta não invasiva útil para um rápido diagnóstico de doenças neurológicas relacionadas ao CMV. Esses autores utilizaram o método da PCR *end-point* de única etapa para detectar DNA de CMV em amostras de LCR de 67 pacientes infectados com HIV. Os testes foram positivos para 21% dos pacientes, 12% dos quais tiveram doenças neurológicas relacionadas ao CMV comprovadas por cultura viral do LCR ou exames histológicos. Encefalite foi o diagnóstico mais frequente em pacientes com resultados de PCR positivos, mas DNA de CMV também estava presente em alguns pacientes com neuropatia periférica ou polirradiculomielite. Todos os pacientes com doença neurológica comprovada por CMV foram positivos por PCR. Em contraste, cultura viral foi negativa para 50% dos pacientes. A especificidade do teste de PCR não pode ser avaliada precisamente devido à falta de padrão-ouro, mas os resultados correlacionaram bem com o curso clínico e com os resultados de outros métodos.

Wildemann *et al.* (1998) testaram amostras de LCR para a presença de DNA de CMV por *nested* PCR em 19 pacientes com AIDS que apresentavam sintomas no SNC. Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para a região da glicoproteína B do gene do CMV. Cinco pacientes tinham infecção ativa no cérebro confirmada por autópsia. Como controle, amostras de LCR foram obtidas de 12 pacientes soronegativos para HIV. Foi detectado DNA de CMV em todos os pacientes com AIDS com encefalite por CMV comprovada por autópsia, em dois de cinco pacientes com AIDS sem encefalite comprovada por autópsia e em nenhum dos cinco indivíduos controles.

Wolf e Spector (1992) avaliaram a utilidade da amplificação do DNA de CMV no LCR para o diagnóstico de doenças do CMV no SNC de pacientes com AIDS. Foi utilizado PCR *end-point* de única etapa com iniciadores construídos para se anelarem com o fragmento da região D do genoma do CMV. Amostras de LCR foram obtidas de trinta pacientes com AIDS que apresentaram sintomas

neuroológicos, e amostras de LCR obtidas de 24 pacientes infectados com HIV assintomáticos foram utilizados como controle. Os resultados da PCR foram correlacionados com achados histopatológicos, cultura de LCR e manifestações clínicas. DNA de CMV foi encontrado em amostras de 46% (14/30) dos pacientes pela PCR. Todas as 24 amostras obtidas do grupo controle foram PCR negativas para CMV. Todos os 11 pacientes com AIDS com evidência histopatológica de infecção por CMV foram PCR positivos no LCR, enquanto todos os nove pacientes sem evidências patológicas de infecção por CMV foram PCR negativos no LCR. Todos os pacientes com cultura positiva de CMV foram PCR positivos no LCR. Também quatro pacientes com cultura negativa, que tinham encefalite por CMV comprovada por exame histopatológico, foram PCR positivos. Assim, a cultura do LCR foi positiva em apenas três dos sete pacientes avaliados por essa metodologia que tinham infecção no SNC, enquanto o PCR foi positivo em todas as amostras.

Gozlan *et al.* (1995) avaliaram a sensibilidade e a especificidade da PCR *end-point* de única etapa para detectar CMV no LCR de pacientes com diagnóstico confirmado de doenças no SNC com AIDS. Foram amplificadas duas regiões específicas do genoma do CMV codificadoras da fosfoproteína pp65 e da proteína principal do capsídeo. O diagnóstico seguro de infecção neurológica relacionada ao CMV foi determinado pela presença de mudanças características provocadas pelo CMV em biópsia de nervos periféricos, necrópsia cerebral, pacientes com diagnóstico clínico de doença neurológica causada pelo CMV, resultados positivos de cultura no LCR ou com uma melhora clínica com terapia para CMV. Essas características foram tomadas com padrão-ouro e a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR foi de 92% e 94%, e os valores preditivos positivos e negativos foram de 86% e 97%, respectivamente. Considerando apenas achados histopatológicos, a sensibilidade e a especificidade da PCR permaneceram altas (92% e 86%, respectivamente).

Boaretti, Scalet e Fontana (2008) avaliaram os resultados de PCR *end-point* de etapa única e *nested* PCR para HSV-1, HSV-2, EBV, VZV e CMV em 226 pacientes, correlacionando-os com a probabilidade clínica e laboratorial de uma infecção viral. Os pacientes foram classificados em quatro grupos (com diagnóstico definitivo, provável, possível ou sem infecção viral no SNC). Todos os pacientes com resultados de PCR positivos tinham um diagnóstico classificado como definitivo, contudo, um resultado negativo não descartou a possibilidade de infecção viral no

SNC. A comparação dos casos considerados prováveis, possíveis ou sem infecção do SNC indicou um valor preditivo positivo de 50%, sensibilidade de 100% e especificidade de 96%. O diagnóstico de infecção viral definitiva do SNC foi 24 vezes mais provável de ocorrer em um paciente com um resultado de PCR positivo do que em um paciente com resultado negativo de PCR. A avaliação da possibilidade de um diagnóstico de infecção viral do SNC em um paciente com resultado de PCR negativo foi baseada na comparação de casos de infecções virais considerados definitivos, prováveis e possíveis com os casos de não infecção viral, o que gerou um valor preditivo negativo de 49%.

Cinque *et al.* (1996a) realizaram um estudo para avaliar a confiabilidade da *nested* PCR no LCR para doenças oportunistas do SNC em pacientes HIV positivos. Amostras de LCR de quinhentos pacientes com sintomas no SNC foram examinados para HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV e HHV-6. Em 219 pacientes, os resultados da PCR foram comparados com achados histopatológicos do SNC, obtidos de autópsias e biópsias cerebrais. DNA de um ou mais vírus foram encontrados no LCR de 181 pacientes (36%), sendo 2% HSV-1, 1% HSV-2, 3% VZV, 16% CMV, 12% EBV e 2% HHV-6. Entre os 219 pacientes com exames histológicos no SNC, HSV-1 e 2 foram detectados em todos os seis pacientes (100%) com infecção por HSV no SNC, CMV em 37 de 45 (82%) com infecção por CMV no SNC e EBV em 35 de 36 (97%) com linfoma primário do SNC. Além disso, HSV-1 foi encontrado em um, VZV em quatro, CMV em três, EBV em três e HHV-6 em sete pacientes sem evidência histológica de doença no SNC. A sensibilidade da técnica de *nested* PCR para CMV foi de 82%, EBV, 97%, HSV-1 e HSV-2 de 100%. A especificidade foi de 98% para CMV, 98% para EBV, 99,5% para HSV-1 e HSV-2. Os valores preditivos positivos e negativos foram, respectivamente, 92% e 95% para CMV, 90% e 99% para EBV e 96% e 100% para HSV-1 e HSV-2.

Conforme Johnson *et al.* (2000), como a infecção por diferentes ou múltiplas espécies de herpesvírus pode causar sintomas similares, testes de PCR foram desenvolvidos para detectar mais de um herpesvírus ao mesmo tempo. Os mesmos estudiosos descreveram e validaram dois testes de PCR que, quando associados com digestão de duas enzimas de restrição, podem amplificar e identificar todos os oito herpesvírus humanos e distinguir entre HHV-6A e HHV-6B. Quando desenvolvidos, esses procedimentos se revelaram simples e de custo efetivo.

Segundo os autores, são bem adaptados para o laboratório clínico e podem ser realizados em um único dia.

A detecção dos herpesvírus pode incluir até a metade do volume de trabalho de muitos laboratórios de virologia diagnóstica. Testes de PCR *multiplex* têm a vantagem adicional de combinar iniciadores que são específicos para vírus associados com diversos diagnósticos diferenciais em um único teste, aumentando, desse modo, a eficiência e o custo efetivo. O aumento da sensibilidade e do tempo de resposta dos testes de PCR têm o potencial de afetar significativamente o manejo do paciente. Também, a capacidade da PCR *multiplex* para gerar resultados inesperados é de particular interesse e muitas vezes de considerável benefício clínico (DRUCE *et al.*, 2002).

Métodos de PCR *multiplex* específicos e sensíveis têm a capacidade de detectar vírus em amostras e locais do corpo em que, anteriormente, eram raramente ou nunca vistos (DRUCE *et al.*, 2002).

Casas *et al.* (1997) desenvolveram uma reação de *multiplex* PCR para permitir uma rápida, sensível e simultânea detecção de sequências específicas de RNA de enterovírus e DNA de herpesvírus em um único tubo. O método envolve uma etapa de transcrição reversa seguida por *multiplex nested* PCR em que a combinação de iniciadores amplifica cDNA de enterovírus e DNA de herpesvírus específicos. Segundo Casas *et al.* (1999), a metodologia de PCR *multiplex* oferece um potencial para um rápido diagnóstico de infecções por herpesvírus em amostras de LCR coletadas logo após o início da doença e fornece uma ferramenta útil para gestão e planejamento de uma terapia antiviral.

Davies *et al.* (2005), na ausência de padrões-ouro alternativos para avaliar os resultados da PCR *multiplex* para diferentes herpesvírus, utilizaram avaliação clínica do risco de um paciente ter uma infecção viral no SNC. Foi utilizado um kit comercial (Innogenetics N.V.) contendo iniciadores para HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV e HHV-6, entre outros agentes etiológicos. Não foi detectado vírus em 70% dos episódios em que uma infecção viral no SNC foi considerada provável, com um valor preditivo negativo para o teste de 82,5%. O valor preditivo positivo do teste foi de apenas 54%. De fato, 25% dos resultados positivos de PCR foram em pacientes nos quais era considerado improvável haver uma infecção viral no SNC. Esse resultado de PCR positivo pode ter ocorrido, segundo o autor, por uma série de razões que incluem: a contaminação do laboratório, apresentação atípica de infecção viral,

etiologia dupla entre os pacientes com outras infecções confirmadas ou reativação viral secundária em resposta ao estresse da doença. EBV foi o vírus detectado predominantemente em episódios em que a infecção viral do SNC foi considerada improvável, e a maioria das amostras HSV-2 positivas no LCR foram de episódios classificados como prováveis infecções virais do SNC.

Abordagens rápidas de sequenciamento de alto rendimento e ferramentas de biologia molecular, em breve, serão usadas rotineiramente para identificar potenciais agentes patogênicos nas situações em que abordagens tradicionais não conseguiriam. Também permitirão a pesquisa de novos patógenos em doenças neurológicas de origem infecciosa e permitirão manipular vias celulares para a terapia antimicrobiana (TYLER, 2009).

2.6.1.1 Limitações das metodologias moleculares aplicadas ao LCR

Existem variáveis importantes que devem ser consideradas quando se seleciona um teste de PCR, sendo elas: a seleção de *primers* que detectam tanto HSV-1 e HSV-2 com sequências genômicas conservadas (que não estejam sujeitas à pressão seletiva), sensibilidade adequada (pelo menos vinte cópias) e especificidade, uso de um padrão internacional ou um plasmídeo para verificar a inibição da PCR, confirmação das bandas positivas por hibridização ou análises por enzimas de restrição (evitar *nested* PCR, se possível), uso de controles positivos e negativos e métodos apropriados para prevenir contaminação da PCR (BOIVIN, 2004).

Dois principais problemas podem ocorrer na rotina de aplicação da PCR: resultados falso-negativos devido à falha da reação ou perda de ácidos nucleicos durante a extração e resultados falso-positivos devido à contaminação com DNA viral exógeno ou *amplicons* de ensaios de PCR anteriores (CASAS *et al.*, 1997).

A capacidade do PCR de gerar e amplificar um elevado número de cópias de DNA a partir da amostra original, que pode conter somente de uma a dez cópias do DNA alvo, é o seu maior mérito e a sua maior limitação. A sensibilidade apurada do teste pode, facilmente, levar a resultados falso-positivos a partir da amplificação de quantidades mínimas de DNA contaminante. Esse problema é bem reconhecido por laboratórios com experiência e controles rigorosos são executados

simultaneamente com as amostras clínicas, utilizando-se todos os reagentes, exceto a amostra do paciente, para assegurar que os reagentes não possuem contaminantes. Os resultados falso-positivos podem ser minimizados com a observação de aspectos como áreas de trabalho exclusivas e reagentes separados para uso exclusivo para os testes de PCR, a frequente troca de luvas e a utilização de fluxos laminares. Resultados falso-positivos devido à deterioração da amostra original, o aquecimento incorreto da amostra ou uso incorreto das proporções das várias misturas de reagentes podem ser facilmente corrigidos (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; DEBIASI; TYLER, 2001).

A interpretação de uma amplificação positiva de genomas de herpesvírus por PCR em tecidos cerebrais de pacientes com distúrbios neurológicos de etiologia incerta pode ser problemática, uma vez que a amplificação de ácido nucleico viral não distingue entre fragmentos genômicos, infecção latente, baixo grau de infecção persistente ou infecção ativa (lítica) persistente. A interpretação de um resultado positivo pode depender do gene (ou dos genes) amplificado e se os métodos utilizados foram concebidos para detectar DNA genômico, RNA ou RNAm (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS; DEBIASI; TYLER, 2001).

Na maioria das infecções virais, altas concentrações de ácido nucleico estão presentes na fase aguda e tipicamente diminuem ao longo do tempo (DEBIASI; TYLER, 1999). O DNA viral desaparece do LCR concomitantemente ao aparecimento de anticorpos intratecais ou como resultado da terapia antiviral (BOIVIN, 2004). Testes de PCR no LCR são, ocasionalmente, negativos em casos verdadeiros de encefalite por HSV devido ao teste precoce (nos primeiros poucos dias após o início dos sintomas), terapia antiviral (após os primeiros 5-7 dias de tratamento) e a presença de inibidores de PCR (BOIVIN, 2004). Puchhammer-stöckl *et al.* (2001) demonstraram que até 25% de casos de encefalite por HSV não foram detectados pela PCR de LCR no diagnóstico agudo, devido à coleta precoce da amostra no curso da doença ou muito tarde após o início do tratamento.

Inibidores da PCR podem estar presentes em fluidos corporais ou tecidos e podem levar a resultados falso-positivos. No LCR, os inibidores mais comumente encontrados são produtos heme que resultam da lise dos eritrócitos. Baixa quantidade de células vermelhas sanguíneas em amostras de LCR não inibem a PCR, mas podem ser um problema em amostras de LCR que estão grosseiramente contaminadas com sangue. Não foi notada inibição em amostras com nível elevado

de proteína ou alta contagem de leucócitos. Ao contrário de outras amostras, o LCR tende a possuir menores concentrações de endonucleases, exonucleases e outras proteínas que possam inibir a ação da enzima DNA polimerase (DEBIASI; TYLER, 1999).

Uma vez que o LCR de pacientes com encefalites causadas pelo HSV frequentemente contém altas concentrações de proteínas e eritrócitos, é necessária a eliminação desses inibidores potenciais pelo pré-tratamento eficaz do LCR para o diagnóstico confiável da encefalite herpética (DENNETT *et al.*, 1991).

Um dos problemas da PCR é que a alta sensibilidade de alguns dos ensaios para herpesvírus, como o EBV e CMV, podem tornar os resultados positivos de difícil interpretação, pois a maioria da população adulta foi infectada com esses vírus e os carrega em seus linfócitos. Quando há incerteza sobre o significado do resultado, a quantidade de vírus no LCR em comparação com o sangue (determinado por PCR quantitativo) geralmente ajuda a resolvê-lo. Por exemplo, em um paciente com HIV, o título de CMV no LCR por PCR, que é maior que o soro, geralmente é significativo (SOLOMON; HART; BEECHING, 2007).

Um teste de PCR no LCR positivo para os herpesvírus linfotrópicos (EBV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8) é uma evidência sugestiva, mas não definitiva de encefalite viral, uma vez que o DNA viral pode ser detectado no LCR de pacientes sem síndromes neurológicas. A biópsia cerebral é necessária para a confirmação do diagnóstico em casos conflitantes de síndromes do SNC por HHV-6 ou HHV-7 (BOIVIN, 2004).

Os herpesvírus podem ser detectados no LCR quando a probabilidade de infecção viral é baixa. Sempre que o HSV-1 for detectado em episódios classificados como pouco prováveis de infecções virais no SNC, um papel patogênico para esse agente não pode ser completamente descartado. Em alguns casos, o significado de um resultado PCR positivo que se encontra fora do fenótipo clínico descrito pode ser corroborado por exames laboratoriais complementares. Evidência de uma resposta imune homóloga viral intratecal pode ser requerida e, se encontrada, fornece uma evidência independente da infecção no SNC (DAVIES *et al.*, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

A experiência adquirida nos últimos anos mostra que os ensaios de PCR são aceitos como o método de escolha para o diagnóstico de infecções por herpesvírus no SNC. O uso de testes para tipos diferentes de vírus no LCR, claramente, tem gerado um aumento significativo na taxa de detecção de infecções virais no SNC (ABERLE; PUCHHAMMER-STÖCKL, 2002).

A detecção dos herpesvírus no LCR pela PCR, em uma população de pacientes com sintomas neurológicos sugestivos de origem viral, indica uma associação com síndromes clínicas não descritas previamente, além daquelas bem conhecidas como a encefalite, meningite e mielite (STUDAHL *et al.*, 2000). Estudos prospectivos devem ser realizados para auxiliar a compreensão do papel dos herpesvírus em outras doenças neurológicas, mas que ainda não tenham sido claramente demonstradas, estarem associados a uma causa infecciosa (MINJOLLE *et al.*, 2002).

O uso de metodologias de PCR sensíveis e reprodutíveis nos permite determinar a frequência das infecções virais no SNC, fornecendo informações úteis sobre os parâmetros clínicos e do LCR associados com essas infecções. Mais estudos são necessários para confirmar a frequência dos vírus que têm sido observados em outros estudos e também para ajudar a entender melhor a patogênese dessas infecções virais no SNC (MENDOZA *et al.*, 2007). O potencial dos herpesvírus menos investigados (CMV, EBV e HHV-6) de produzirem doenças em pacientes imunocompetentes precisa ser definido. A clarificação do papel patogênico desses vírus é necessária, tendo em vista a multiplicidade de quadros clínicos observados (STUDAHL *et al.*, 2000).

A utilização empírica do Aciclovir é uma conduta comum (SANTOS *et al.*, 2010), pois trata-se de um inibidor altamente efetivo da replicação de HSV-1, HSV-2 e VZV (KEENEY; KIRK; BRIGDEN, 1982). Contudo, a insuficiência renal aguda (IRA) ocorre em 20% dos pacientes que recebem o medicamento por via endovenosa (PACHECO *et al.*, 2005). Em pacientes com alteração do nível de consciência de início súbito com histórico de comprometimento hepático, essa prática torna-se arriscada. Um diagnóstico específico dos herpesvírus no LCR, realizado por meio das técnicas de biologia molecular e o conhecimento dos perfis clínicos provocados pelos diferentes vírus nos SNP e SNC, permitirá estabelecer o

prognóstico correto, bem como empregar uma terapia adequada nos pacientes acometidos por essas infecções.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Descrever características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais de pacientes com meningoencefalites e encefalites causadas por vírus da família *Herpesviridae*, diagnosticados pelo método de PCR *end point* e compará-las entre os pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer e padronizar a técnica para pesquisa de herpesvírus humanos no LCR por meio das técnicas de *nested* PCR e PCR, seguida por análises de produtos digeridos com enzimas de restrição.
- Descrever características demográficas e clínico-epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com vírus da família *Herpesviridae*.
- Estabelecer a associação dos tipos de herpesvírus humanos com relação à evolução clínica, presença de comorbidades e alterações no líquido cefalorraquidiano.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo faz parte de um projeto piloto denominado "Caracterização do perfil epidemiológico e identificação molecular da etiologia das meningites assépticas/virais no município de Curitiba e região metropolitana do estado do Paraná" e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (anexo), com registro no BANPESQ sob o número 2005016889.

5.1 CASUÍSTICA

Foi realizado um estudo prospectivo em que foram analisados pacientes com quadros de meningoencefalites e encefalites virais, cujas amostras de LCR foram positivas para vírus da família *Herpesviridae* (HSV, VZV, CMV, EBV e HHV-6), no período de julho de 2005 a setembro de 2008. As amostras foram encaminhadas à seção de virologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do HC-UFPR e são provenientes de dois hospitais referência para o atendimento de pacientes de Curitiba e região metropolitana: HC-UFPR e Hospital Pequeno Príncipe (HPP).

5.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

- a) Foram incluídos no estudo pacientes: com alterações citológicas e bioquímicas de LCR características de meningite viral – leucócitos aumentados (> 4 células/mm³) com predomínio de linfócitos, glicose ≥ 40 mg/dL e proteína total normal ou aumentada (punção lombar concentração normal é 15-45 mg/dL, punção suboccipital é 10-25 mg/dL) e ácido láctico inferior a 3,5 mmol/L; imunocomprometidos, independente das alterações citológicas e bioquímicas de LCR; com suspeita clínica de encefalites virais, independente de alteração citológica e bioquímica do LCR.
- b) Foram excluídos do estudo pacientes: com amostras de LCR com características bioquímicas e citológicas de meningites bacterianas ou

bactéria isolada ou identificada nos métodos bacteriológicos (coloração de gram e/ou culturas e/ou prova do látex); micológico direto e/ou cultura para fungos positiva; pesquisa de antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans* pela prova do látex positiva.

5.1.2 Grupo de estudo

O grupo de estudo foi constituído por 1.010 pacientes, sendo 56,49% (570/1010) do sexo masculino e 43,50% (439/1010) do sexo feminino. Em 0,09% (1/1010), o dado não foi disponibilizado. A média de idade foi de $12,16 \pm 15,66$ anos, mediana de 6,20 anos (IIQ 25-75, 3,00-12,00).

5.1.3 Classificação de acordo com características imunológicas do paciente

Pacientes imunocompetentes ($n = 18$) são os que não apresentavam doenças de base e não estavam em uso de corticosteroides.

Imunocomprometidos ($n = 21$) são os pacientes que apresentavam alguma doença de base, uso de medicação (corticoides) ou procedimentos terapêuticos que levam a imunocomprometimento (infecção por HIV, esclerodermia, *diabetes mellitus*, transplante de medula óssea, transplantes de órgãos sólidos e neoplasias).

5.1.4 Classificação em encefalite, meningoencefalite e mielite

Os pacientes foram classificados em meningoencefalite, encefalite ou mielite, de acordo com critérios clínicos, características bioquímicas e citológicas de LCR, neuroimagem e/ou eletroencefalográfico (EEG).

Meningoencefalite viral ($n = 16$) foi diagnosiada em pacientes com sinais e sintomas de irritação das meninges, como febre, cefaleia e sinais meningorradiculares –rigidez de nuca, sinais de Kerning e/ou Brudzinski e confusão mental (ROMERO; NEWLAND, 2003). LCR com leucócitos aumentados (> 4 células/mm³), com predomínio de linfócitos, glicose normal (≥ 40 mg/dL), proteína

total normal ou aumentada (punção lombar concentração normal é 15-45 mg/dL, punção suboccipital é 10-25 mg/dL) e ácido láctico inferior a 3,5 mmol/L (SOLOMON; HART; BEECHING, 2007).

Os pacientes diagnosticados com encefalites ($n = 23$) apresentaram alterações citológicas e bioquímicas de LCR, ou não, e os seguintes sintomas: febre, alteração de consciência, convulsões, sinais neurológicos focais e/ou comprometimento de parênquima encefálico demonstrada por neuroimagem (TAC e/ou RNM) e alteração de EEG (SOLOMON; HART; BEECHING, 2007).

A mielite ($n = 1$) foi diagnosticada em paciente apresentando febre e sinais de comprometimento de medula espinhal com evidência de inflamação e lesão na medula espinhal demonstrada por RNM (IRANI, 2008). Na figura 2 está representada a amostragem do estudo.

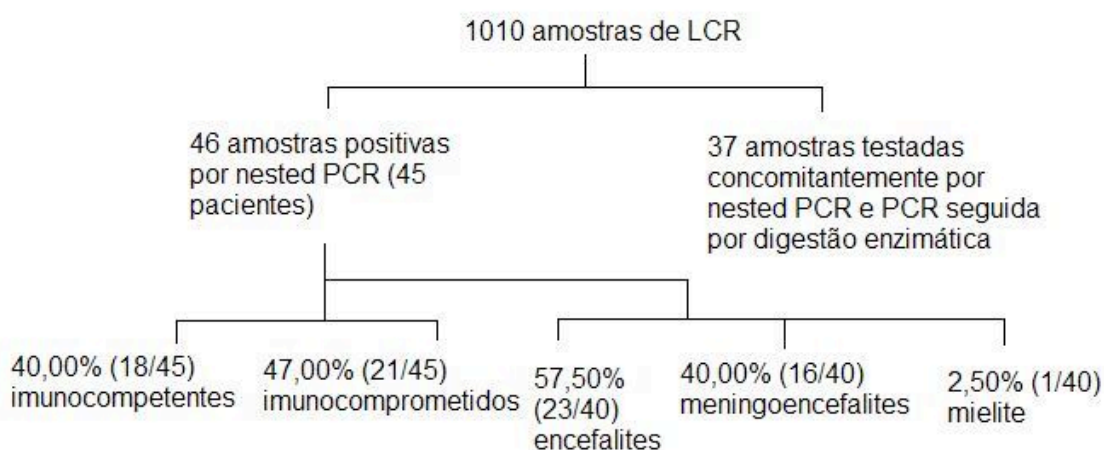


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA AMOSTRAGEM DO ESTUDO.
FONTE: o autor (2011).

5.2 MÉTODOS

As amostras de LCR foram coletadas em tubos livres de RNases e DNases esterilizados, e encaminhadas imediatamente ao laboratório de virologia do HC-UFPR em temperatura de 4°C. No laboratório, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C por no máximo 5 dias, até serem processadas. Os dados de

sazonalidade e temperatura atmosférica foram obtidos pelo Instituto Tecnológico Simepar.

5.2.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído com a utilização de tampão de lise contendo tiocianato de guanidina (GUSCN) (CASAS *et al.*, 1995).

A amostra de LCR (1mL) foi centrifugada por dez minutos (14000 x g a 4°C) e 50µL do material concentrado foi utilizado para a extração. Em microtubo com capacidade para 1,5ml livre de DNases e RNases, adicionou-se 200µl de tampão de lise contendo: isotiocianato de guanidina 4M, 0,5% de N-lauril sarcosina, 1mM de ditioneitol (DTT), 25mM de citrato de sódio, 20µg/tubo de glicogênio, cem cópias de plasmídeo com inserto de pseudo rabies vírus (PRV), que consiste no controle interno da reação, e 50µl do LCR. Após homogeneizar, incubou-se o material durante dez minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 250µL de álcool isopropílico a -20°C e homogeneizou-se novamente. Então, o material foi centrifugado por dez minutos, 14000 x g a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante. Posteriormente, lavou-se o sedimento com 500µL de etanol 70%. Após homogeneização e centrifugação, como descritas anteriormente, o sobrenadante foi descartado. O tubo foi mantido aberto a 56°C durante dez minutos para evaporação total do etanol. O sedimento obtido contendo o ácido nucleico foi ressuspensão em 22µL de água ultrapura, previamente tratada com dipiropiridoxato, com o objetivo de eliminar as RNases/DNases, prevenindo a degradação do ácido nucleico extraído.

5.2.2 Amplificação por PCR e identificação do produto por restrição enzimática

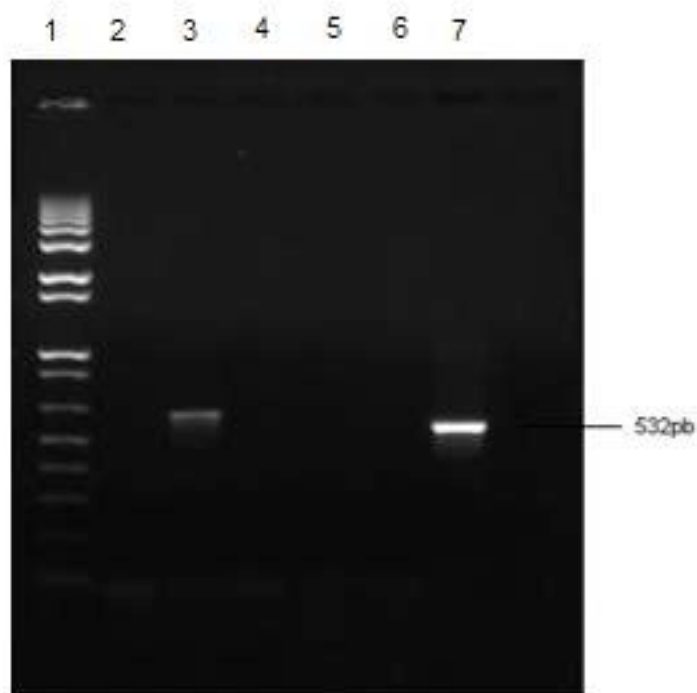
A metodologia permite a detecção e identificação das oito espécies de herpesvírus humanos, incluindo a diferenciação dos herpesvírus humanos tipo 6 (HHV-6 A e B). Para o desenvolvimento da técnica, foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (quadro 1), seguido de análises por enzimas de restrição com *BamHI* e *BstUI*. O par de oligonucleotídeos HSV-P1 e HSV-P2 (Pan

Herpes 1) foi utilizado para amplificar os vírus HSV-1, HSV-2, EBV, CMV e HHV-8. O par VZV-P1 e VZV-P2 (Pan Herpes 2) foi utilizado para amplificar VZV, HHV-6A ou HHV-6B e HHV-7. Os iniciadores foram desenhados para uma região conservada do gene da DNA polimerase viral, após alinhamento das sequências do DNA relacionadas às oito espécies de herpesvírus humano, conforme previamente descrito (JHONSON *et al.*, 2000).

Cada reação de PCR foi realizada em tubo de 0,2 ml em um volume total de 25µL. Cada reação continha: 2,5µL de tampão 10 X concentrado (Invitrogen), 25 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 1,25mM de cada deoxinucleosídeos trifosfatos (dNTPs) (Invitrogen), 1,25µl de dimetilsulfóxido (DMSO:Sigma), 37,5pmol de cada iniciador, 2,5 U de Taq polimerase (Invitrogen), água de alto grau molecular e 2,5 µL do DNA extraído. O PCR foi realizado em termociclador Eppendorf. Para o par HSV-P1 e HSV-P2 (Pan Herpes 1), os parâmetros de ciclagem foram 1 ciclo de 95°C por 12 minutos, 3 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 37 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, 1 ciclo de 72°C por 3 minutos. Para o par VZV-P1 e VZV-P2 (Pan Herpes 2), os parâmetros de ciclagem foram 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 47°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 1 ciclo de 72°C por 3 minutos. Os produtos obtidos foram identificados em gel de agarose e o tamanho estimado para Pan Herpes 1 foi de 532 pares de base e para Pan Herpes 2 de 536 pares de base. Foram utilizados controles positivos e negativos para o controle da qualidade das reações.

As amostras que apresentaram produtos com tamanhos aproximados de 532 ou 536 pares de base foram selecionadas para tratamento com enzimas de restrição *BamHI* e *BstUI*. A mistura da reação continha 10µL da mistura da reação de PCR, 1,5µL do tampão apropriado da enzima, 1µL da enzima e 2,5µL da água destilada para um volume total de 15µL. A mistura da reação foi incubada por 1 hora a 37°C para digestão com a enzima *BamHI* ou 60°C para a enzima *BstUI*.

Após essa etapa, o material genético digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e identificado de acordo com os padrões de corrida especificados para cada vírus por Jhonson *et al.* (2000). A figura 3 mostra um gel de agarose com amostra positiva para Pan Herpes 2 com 536 pares de base e a figura 4 mostra gel de agarose após a clivagem dessa mesma amostra, com resultado positivo para HHV-6A. O protocolo utilizado para a execução dessa metodologia encontra-se no apêndice 1.



Legenda: coluna 1 – peso molecular; coluna 3 – amostra positiva; colunas 2, 4 e 5 – amostras negativas; coluna 6 – controle negativo; coluna 7 – controle positivo.

FIGURA 3 – TAMANHO DOS PRODUTOS OBTIDOS APÓS PCR PARA PAN HERPES. AMOSTRAS TESTADAS, CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO.

FONTE: o autor (2011).



Legenda: coluna 1 – peso molecular; coluna 3 – clivagem com *BstUI*; coluna 5 – clivagem com *BamHI*; coluna 7 – produto não clivado.

FIGURA 4 – GEL DE AGAROSE APÓS CLIVAGEM DO PRODUTO DE PCR DA AMOSTRA POSITIVA PARA HHV-6 TIPO A.

FONTE: o autor (2011).

Nome	Sequência 5' – 3'	Características
HSV P1 Reverse	TAAACATGGAGTCCGTGTCGCCGTAGATGA	Iniciadores Pan Herpes 1 para detecção de HSV 1, HSV 2, CMV, EBV, CMV e HHV 8
HSV P1 Forward	GTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC	
VZV P1 Reverse	ATAAACACACAATCCGTATCACCATAAATAACCT	Iniciadores Pan Herpes 2 para detecção de VZV, HHV6 tipo A, HHV6 tipo B, HHV 7
VZV P1 Forward	GTCGTGTTTGATTTTCAAAGTTTATATCC	

QUADRO 1 – INICIADORES UTILIZADOS NA METODOLOGIA DE PCR SEGUIDA PELA IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E SUAS CARACTERÍSTICAS.

FONTE: adaptado de Johnson *et al.* (2000).

5.2.3 *Nested* PCR – 1º PCR

A metodologia de *multiplex nested* PCR foi modificada do estudo de Casas *et al.* (1997) para a realização de *singleplex nested* PCR. A amplificação do DNA viral foi realizada em uma reação de PCR com uma solução contendo 10 mM de Tris – HCl (pH 8.3), 500 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 0,5 mM de cada dNTP, 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, reverso e senso, e 2.5 unidades de *Taq* polimerase (Invitrogen). A amplificação foi executada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal). As amostras foram submetidas a um ciclo inicial de 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Posteriormente, 45 ciclos com 30 segundos de desnaturação (94°C), 30 segundos de anelamento (64°C) e 30 segundos de extensão (72°C) foram realizados seguidos de uma incubação inicial a 72°C por 5 minutos.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados a partir dos genes da DNA polimerase dos herpesvírus. Eles foram adaptados da metodologia de Casas *et al.* (1997) e estão descritos no quadro 2.

Nome	Sequência 5' – 3'	Características
HSV P1 Reverse	ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT	Iniciador para HSV <i>nested</i> PCR, primeiro par de PCR.
HSV P1 Forward	CGCATCATCTACGGGGACACGGA	
HSV P2 Reverse	GGTGAACGTCTTTTCGAACTC	Iniciador para HSV <i>nested</i> PCR, segundo par de PCR.
HSV P2 Forward	GTGTTGTGCCGCGGTCTCAC	
VZV P1 Reverse	ATTACCCCAATGTACTTTTTCTT	Iniciador para VZV <i>nested</i> PCR, primeiro par de PCR.
VZV P1 Forward	AAGGTTATATATGGAGATACGGA	
VZV P2 Reverse	TATAAAAGTTTTTTCACACTC	Iniciador para VZV <i>nested</i> PCR, segundo par de PCR.
VZV P2 Forward	TGAGGGGATAGCTAAAATCG	
CMV P1 Reverse	ACTTTGCCGATGTAACGTTTCTT	Iniciador para CMV <i>nested</i> PCR, primeiro par de PCR.
CMV P1 Forward	CGGGTCATCTACGGGGACACGGA	
CMV P2 Reverse	GACGAAGACCTTTTCAAACCTC	Iniciador para CMV <i>nested</i> PCR, segundo par de PCR.
CMV P2 Forward	GGGCCAGCCTGGCGCACTA	
HHV-6 P1 Reverse	TGTCTACCAATRTATCTTTTTTT	Iniciador para HHV-6 <i>nested</i> PCR, primeiro par de PCR.
HHV-6 P1 Forward	GAGGTAATYTATGGTGATACGGA	
HHV-6 P2 Reverse	ACATAAAATCTTTTCAAACCTC	Iniciador para HHV-6 <i>nested</i> PCR, segundo par de PCR.
HHV-6 P2 Forward	GCCAAACATATCACAGATCG	
EBV P1 Reverse	AGCACCCCCACATATCTCTTCTT	Iniciador para EBV <i>nested</i> PCR, primeiro par de PCR.
EBV P1 Forward	CGAGTCATCTACGGGGACACGGA	
EBV P2 Reverse	GGAGAAGGTCTTCTCGGCCTC	Iniciador para EBV <i>nested</i> PCR, segundo par de PCR.
EBV P2 Forward	ACCCGGAGCCTGTTTGTAGC	

QUADRO 2 – INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE BIOLOGIA MOLECULAR PELA METODOLOGIA DE *NESTED* PCR E SUAS CARACTERÍSTICAS.

FONTE: adaptado de Casas *et al.* (1997).

5.2.3.1 *Nested* PCR – 2° PCR

A mistura de reação da *nested* PCR continha 60 mM de Tris – HCl (pH 8,5), 15 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgCl₂, 0,5 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, reverso e senso, e 1,25 U de *Taq* polimerase. A amplificação deu-se nas mesmas condições utilizadas na primeira amplificação, exceto que o primeiro ciclo foi substituído com um passo de desnaturação a 94°C por dois minutos e a temperatura de anelamento a 47°C. Um total de trinta ciclos foi utilizado para completar a amplificação.

Após a conclusão da amplificação, alíquotas de 10 µL de cada mistura de reação de PCR foram analisadas por eletroforese através de gel de agarose 4% (Invitrogen), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio em géis de tampão TBE. Produtos de 120pb para HSV, 98 pb para VZV, 78 pb para CMV, 66 pb para HHV-6 e 54 pb para EBV foram visualizados sobre luz UV. Um marcador de peso molecular de 1kb de DNA (Invitrogen) foi incluído em cada gel. O protocolo utilizado para a realização desta metodologia encontra-se no apêndice 2.

5.2.4 Comparações entre as técnicas de biologia molecular para pesquisa de herpesvírus humanos no LCR

Entre fevereiro e julho de 2008, 37 amostras de LCR selecionadas aleatoriamente foram testadas concomitantemente por *nested* PCR e PCR seguida de restrição enzimática, com a finalidade de comparar as duas técnicas de biologia molecular (CASAS *et al.*, 1997; JHONSON *et al.*, 2000).

Os resultados de ambas as metodologias foram comparados utilizando-se o teste exato de Fisher e as concordâncias com o índice Kappa. A metodologia de *nested* PCR foi a que apresentou maior porcentagem de positividade em pacientes com indicações clínicas de meningoencefalites, encefalites e mielite virais e foi, portanto, definida para o desenvolvimento do estudo.

5.2.5 Sequenciamento

Selecionou-se uma amostra que apresentou banda do tamanho esperado para o vírus herpes simplex em ambas as metodologias. Não foi possível sequenciar todas as amostras positivas por ambas as metodologias devido à restrição de verba. O produto obtido na metodologia de PCR seguida por restrição enzimática foi purificado com o kit de purificação (*PureLink™ Quick Gel Extraction Kit*, Invitrogen™) e, posteriormente, foi encaminhado para sequenciamento nucleotídico no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp, Campinas, SP. Foi utilizado o *Kit BigDye terminator v3.1* e um sequenciador capilar de DNA (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer – Applied Biosystems™ – Hitach). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Bioedit (*Bioedit sequence alignment editor*) e submetidas a um BLAST (<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>).

5.2.6 Características demográficas, clínicas e laboratoriais

As características demográficas, comorbidades e achados laboratoriais dos pacientes com resultados positivos pela metodologia de *nested* PCR (n = 45) foram obtidas nos prontuários médicos e no sistema informatizado de laudos do HC-UFPR (apêndice 3). As características de alguns pacientes não foram disponibilizadas e, portanto, quando descritas neste trabalho, apresentam uma amostragem menor do que o número total de pacientes. Os dados dos três pacientes do HPP com resultados positivos para herpesvírus no LCR não foram disponibilizados.

5.2.7 Análises citológica e bioquímica do LCR

5.2.7.1 Análise citológica do LCR

A análise citológica quantitativa do LCR foi realizada em câmara de Fuchs Rosenthal, valor normal inferior a 5 células/mm³. A análise citológica diferencial foi realizada sedimentando-se aproximadamente 400 µl de LCR em citofunil adaptado à

citocentrífuga *Shandon Cytospin* (Pittsburgh, EUA) e submetido a um programa de rotação de três minutos a 900rpm. Após sedimentação, as lâminas foram coradas com corante May Grünwald e visualizadas no microscópio ótico (FISHMAN, 1992).

5.2.7.2 Análise bioquímica do LCR

A quantificação de glicose foi realizada pelo método da Hexoquinase/G-6-PD, considerado valor normal superior a 40mg/dL (FISHMAN, 1992).

Para quantificação das proteínas totais, foi utilizado o método de vermelho de pirogalol, considerado valor normal para LCR suboccipital 10-25 mg/dL e para LCR lombar 15 a 45mg/dL (FISHMAN, 1992).

Para quantificação de ácido láctico, foi utilizado *dimension AR* (Dade Behring, Deerfield, IL, EUA). O valor esperado foi inferior a 3,5 mmol/L (ALMEIDA, 2009).

5.2.8 Procedimentos estatísticos

Os resultados estão apresentados como médias e desvios-padrão, medianas e interquartil, ou frequências e porcentagens. Para as análises estatísticas, foram utilizados os aplicativos JMP™ 5.1.2 e GraphPad Prism® 5.04. Variáveis quantitativas foram analisadas por meio de testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. O teste exato de Fisher foi usado para as análises qualitativas. Para comparação das concordâncias entre as técnicas de PCR estudadas, foi aplicado o Índice Kappa. Um valor $p \leq 0,05$ foi considerado significativo e indicado com um asterisco (*).

6 RESULTADOS

6.1 COMPARAÇÕES ENTRE AS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA PESQUISA DE HERPEVÍRUS HUMANOS NO LCR

Foi realizado PCR por ambas as metodologias concomitantemente em 37 amostras. A positividade da metodologia de *nested* PCR foi de 19% (7/37) e da metodologia de PCR seguida por restrição enzimática foi de 8,10% (3/37) ($p = 0,06$). A concordância foi de 81% (30/37) e a discordância foi de 20,00% (7/37). O índice Kappa ($k = 0,39$; desvio padrão 0,21, I.C 95% -0,03, 0,79) mostrou uma concordância fraca entre as metodologias (tabela 1).

TABELA 1 – ANÁLISE DE CONTINGÊNCIA ENTRE AS 37 AMOSTRAS ANALISADAS CONCOMITANTEMENTE PELA METODOLOGIA DE PCR SEGUIDA POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA E *NESTED* PCR.

Resultados n (% total)	Negativo <i>nested</i>	Positivo <i>nested</i>	Total
Negativo E.R.	27 (73)	7 (19)	34 (92)
Positivo E.R.	0 (0)	3 (8)	3 (8)
Total	27 (73)	10 (27)	37

FONTE: o autor (2011).

NOTA: E.R. = enzima de restrição.

6.2 POSITIVIDADE DA PCR RELACIONADA AO NÚMERO DE HEMÁCIAS E TEMPO DE COLETA DE LCR APÓS INÍCIO DOS SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS

Nas amostras de LCR com resultados positivos pela metodologia de *nested* PCR ($n = 46$) a mediana de hemácias foi de 8,8 (IIQ 25-75, 3-119,2) e nas amostras com resultados negativos a mediana foi de 6 (IIQ 25-75, 1,5-95) ($p = 0,23$). No grupo de pacientes com resultados positivos, 97,5% (40/41) das amostras tinham presença de hemácias no LCR (os dados de LCR de cinco mostras não foram disponibilizados) e no grupo de pacientes com resultados negativos 91,2% (884/969)

dos pacientes tinham hemácias no LCR. A análise qualitativa não foi significativa ($p = 0,25$).

O intervalo médio de tempo entre o início dos sintomas e a realização da PCR nos pacientes com resultados positivos de *nested* PCR para vírus da família *Herpesviridae* no LCR foi de $16,6 \pm 18,4$ dias, sendo a mediana de 10 dias (IIQ, 25 – 75, 3 – 21). Para o HSV ($n = 8$), o intervalo médio foi de $10,25 \pm 7$ dias, mediana de 12,50 (IIQ 25-75, 2,5-16,5); para o VZV ($n = 2$) $42 \pm 22,63$ dias, mediana de 42 dias (IIQ 25-75, 26-58); EBV ($n = 11$) $13,09 \pm 9,86$ dias, mediana de 13 (IIQ 25-75, 2-22); CMV ($n = 5$) $18 \pm 23,98$ dias, mediana 10 (IIQ 25-75, 3-37); HHV-6 ($n = 6$) $22,5 \pm 26,97$, mediana 8,5 (IIQ 25-75, 3-50,5). Houve um decréscimo de amostras positivas com o aumento de dias entre o início dos sintomas e a data da realização da *nested* PCR. O maior número de amostras positivas, 32,4% (12/37), foi identificado até cinco dias após o início dos sintomas conforme demonstrado na figura 5 (os dados de oito pacientes não foram disponibilizados).

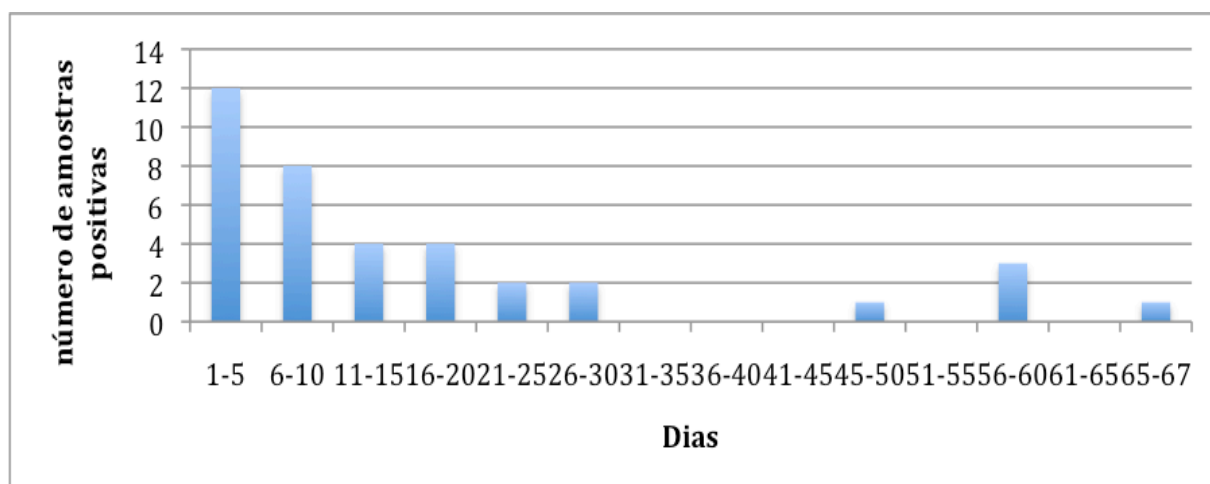


FIGURA 5 – NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA VÍRUS DA FAMÍLIA *HERPESVIRIDAE* POR *NESTED* PCR CORRELACIONADAS COM A DATA DE INÍCIO DOS SINTOMAS ($n = 37$).
FONTE: o autor (2011).

6.3 SEQUENCIAMENTO DE AMOSTRA POSITIVA

Com a finalidade de avaliar os iniciadores da metodologia de PCR seguida por digestão enzimática e tipificar o HSV, uma amostra de LCR foi sequenciada. A amostra de LCR pertencia a uma paciente feminina de 11 anos de idade (caso número 40), internada no HC-UFPR em 2006, que apresentou um quadro de

encefalite por HSV após cirurgia para epilepsia em lobo temporal. A paciente apresentava história prévia de meningoencefalite por HSV aos oito meses de idade, tratada adequadamente com Aciclovir. Apresentava como sequelas crises convulsivas parciais complexas. As convulsões foram controladas por três anos e, em 2001, crises parciais complexas iniciaram, com episódios de generalização secundária. Imagens de ressonância magnética mostraram sequelas da lesão no lobo temporal direito.

Dez anos depois, as convulsões aumentaram em frequência e mudaram o padrão com reflexo oculocefálico seguido de crises convulsivas do tipo tônico-clônicas generalizadas. Após a cirurgia, em 2006, a paciente apresentou uma reativação do vírus latente no lobo temporal. Foram realizadas as metodologias de *nested* PCR e PCR seguida de digestão por enzima de restrição realizado no LCR, que resultaram positivas. A amostra foi sequenciada. Na análise, encontrou-se 99% de identidade com o gene UL30 da DNA polimerase vírus HSV-1 (apêndice 4).

6.4 DISTRIBUIÇÃO DOS VÍRUS DA FAMÍLIA *HERPESVIRIDAE* ENCONTRADOS

A porcentagem de vírus da família *Herpesviridae* encontrados foi de 4,7% (48/1010 vírus em 46 amostras pertencentes a 45 pacientes). Um total de 73,3% (33/45) dos pacientes foram hospitalizados com um tempo mediano de internamento de 19 dias (IIQ, 25-75, 9 – 37,5) e 20% (9/45) foram atendidos no pronto atendimento ambulatorial, ambos no HC-UFPR. Pacientes pediátricos que foram atendidos no Hospital Pequeno Príncipe foram 6,7% (3/45).

Entre os vírus positivos, 31% (15/48) eram EBV e 29% (14/48) HSV. Coinfecções virais foram encontradas em 8,6% (4/46) das amostras, sendo 4,3% (2/46) Enterovirus/EBV, 2,2% (1/46) CMV/HSV e 2,2% (1/46) HHV-6/CMV (figura 6).

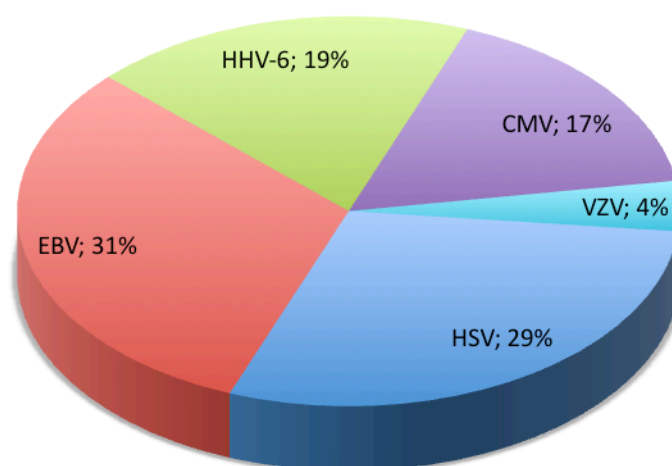


FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS HERPESVÍRUS IDENTIFICADOS NAS 46 AMOSTRAS POSITIVAS PARA HERPESVÍRUS.
FONTE: o autor (2011).

Em um paciente, houve a detecção de dois herpesvírus durante o mesmo internamento, porém, em amostras coletadas em datas diferentes, HSV em agosto de 2008 e CMV em setembro de 2008.

6.5 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS

Um total de 57% (26/45) dos pacientes com reação de PCR positiva no LCR eram masculinos e 94% (36/38) raça branca. Apresentavam uma mediana de idade de 32 anos (IIQ 25-75, 13 – 42,5). O maior número de infecções virais foi encontrado em pacientes com 31 a 50 anos de idade, em que o DNA para herpesvírus foi encontrado em 41,86% (18/43) das amostras (em dois pacientes não foi possível obter o dado). Nessa faixa de idade, 38,88% (7/18) dos pacientes apresentaram infecções por EBV. A distribuição das idades dos pacientes com herpesvírus detectado no LCR está demonstrada na figura 7.

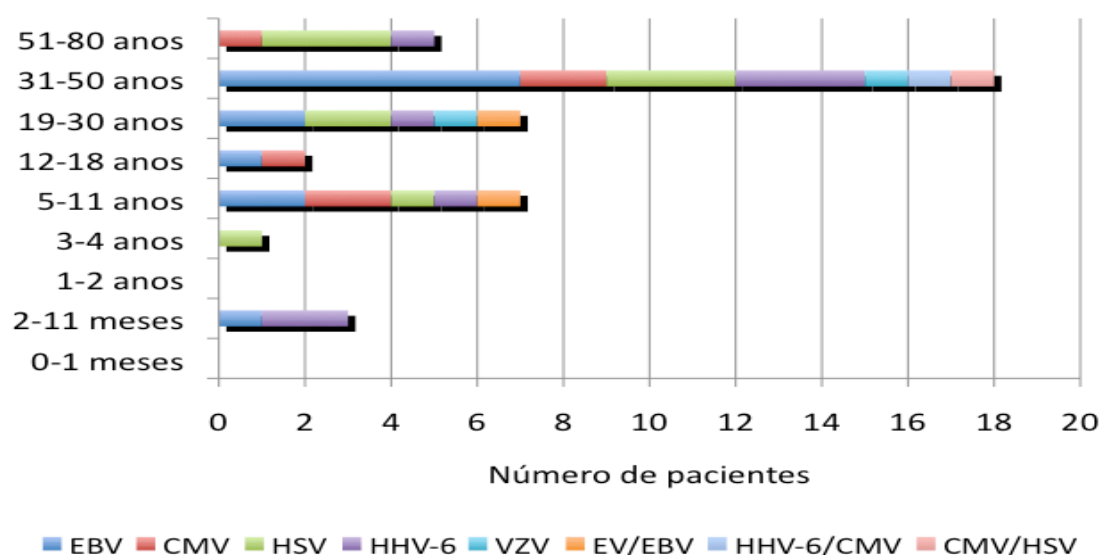


FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO DOS HERPESVÍRUS ENCONTRADOS POR FAIXA ETÁRIA (n = 43).
 FONTE: o autor (2011).

No período estudado, não houve correlação entre a distribuição das amostras positivas e pluviosidade, temperatura atmosférica e sazonalidade na cidade de Curitiba-PR (figuras 8 e 9).

A letalidade observada foi de 12,2% (5/41), sendo que os dados de quatro pacientes não foram disponibilizados. Óbito de pacientes infectados com HSV foram 25% (2/8), por HHV-6 12,5% (1/8), EBV 7,69% (1/13) e HSV e CMV, em amostras diferentes do mesmo paciente, em 100% (1/1).

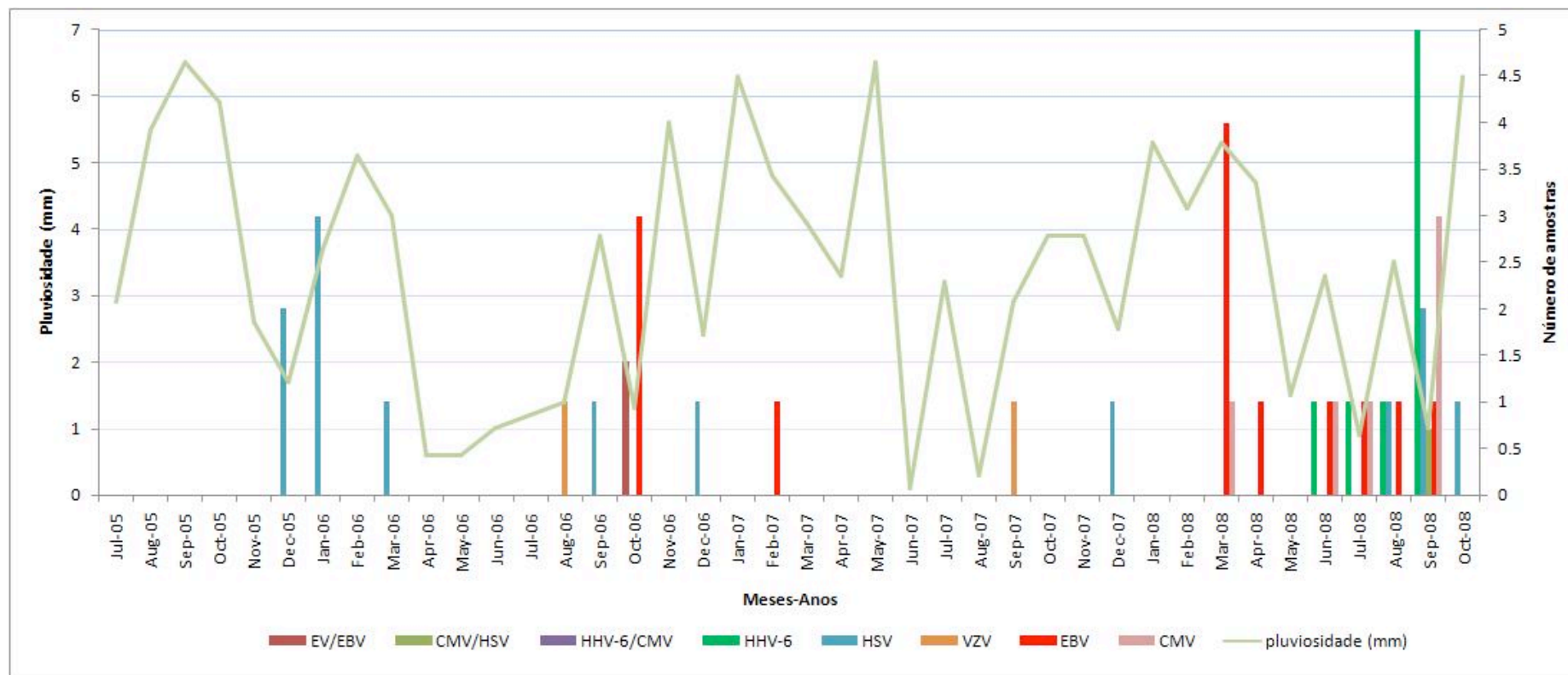


FIGURA 8 – PLUVIOSIDADE E NÚMERO DE AMOSTRAS DE LCR POSITIVAS PARA HERPESVÍRUS ENTRE 2005 E 2008 NA CIDADE DE CURITIBA-PR.
 FONTE: Simepar (2011).

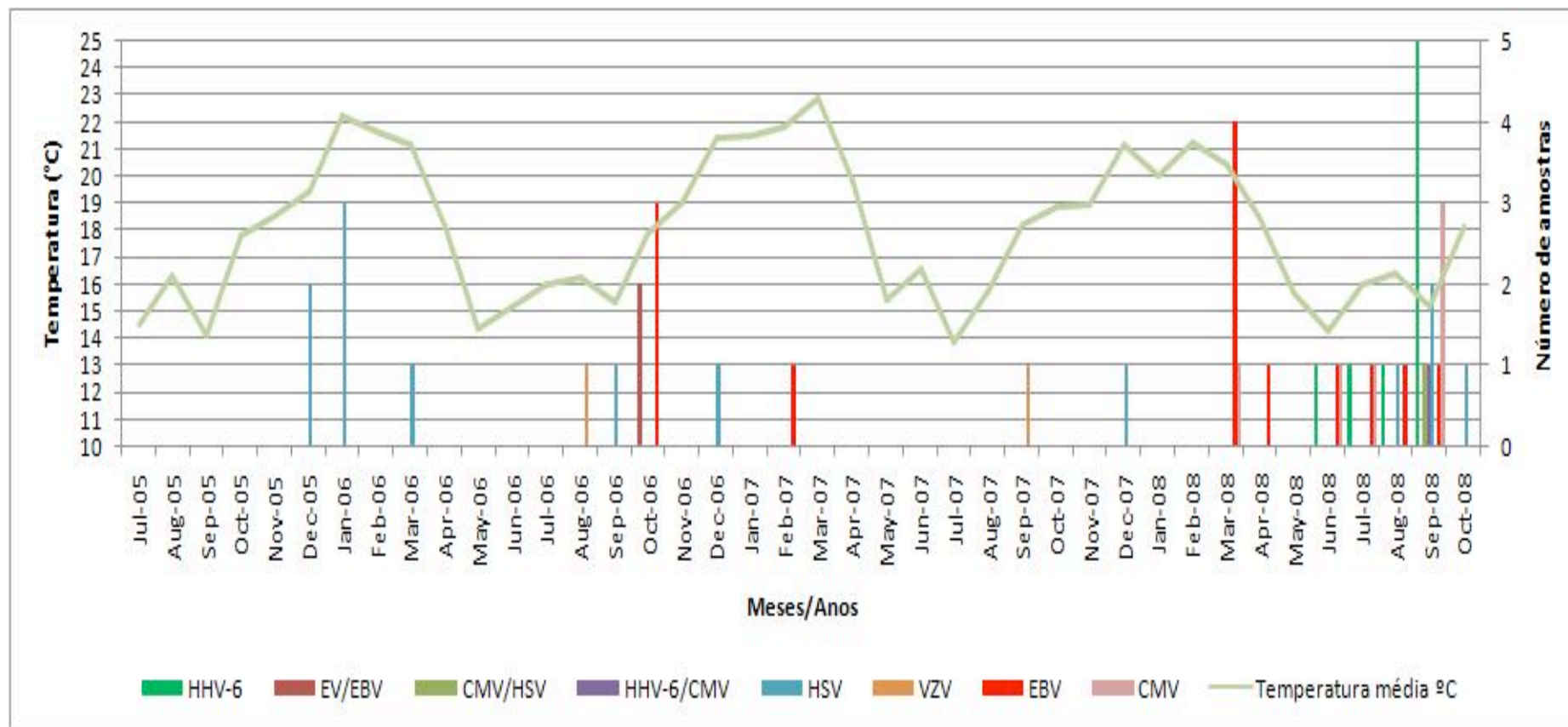


FIGURA 9 – TEMPERATURA ATMOSFÉRICA E NÚMERO DE AMOSTRAS DE LCR POSITIVAS PARA HERPESVÍRUS ENTRE 2005 E 2008 NA CIDADE DE CURITIBA-PR.

FONTE: Simepar (2011).

6.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS GRUPOS DE PACIENTES IMUNOCOMPETENTES E IMUNOCOMPROMETIDOS

Os pacientes analisados foram classificados em dois grupos, o grupo I, composto pelos pacientes imunocompetentes (40%; 18/45), e o grupo II, composto pelos pacientes imunocomprometidos (47%; 21/45), em 13% (6/45) dos pacientes, os dados não foram obtidos ($p = 0,67$).

Uma ou mais causas de imunocomprometimento foram encontradas nos pacientes do grupo II, sendo HIV em 66,7% (14/21), transplante de medula óssea (TMO) em 14,3% (3/21), linfoma de Hodgkins em 4,8% (1/21), *diabetes mellitus* em 14,3% (3/21), transplante hepático devido à hepatite autoimune em 4,8% (1/21), esclerodermia em 4,8% (1/21) e carcinoma de nasofaringe metastático 4,8% (1/21).

As causas de imunocomprometimento por vírus diagnosticados no LCR estão na tabela 2.

TABELA 2 – CAUSAS DE IMUNOCOMPROMETIMENTO POR VÍRUS DA FAMÍLIA *HERPESVIRIDAE* DIAGNOSTICADAS.

Causas	HSV (n=6)		EBV (n=8)		CMV (n=3)		HHV-6 (n=1)	
	M	E	M	E	M	E	M	E
	n	n	n	n	n	n	n	n
HIV	1	2	2	3	1			
HIV/DM	1							
HIV/DM/LH							1	
DM		1						
TMO				1		2		
TOS			1					
CNM				1				
Esclerodermia	1							

FONTE: o autor (2011).

NOTA: M – meningoencefalite; E – encefalite; DM – *diabetes mellitus*; LH – linfoma de Hodgkins; TOS – transplante de órgãos sólidos; CNM – carcinoma de nasofaringe metastático.

Observou-se uma distribuição diferente dos vírus identificados nos dois grupos, no grupo I (imunocompetentes), os vírus encontrados foram o HHV-6 (33%; 6/18), o EBV (28%; 5/18), HSV (11%; 2/18), VZV (11%; 2/18), EV/EBV (11%; 2/18) e CMV (5,5%; 1/18). No grupo II (imunocomprometidos), foram o EBV (36%; 8/22), o HSV (32%; 7/22), CMV (18,2%; 4/22), HHV-6 (4,5%; 1/22), CMV/HSV (4,5%; 1/22),

HHV-6/CMV (4,5%; 1/22). Coinfecção viral foi encontrada em 11% (2/18) e 9% (2/22), respectivamente. Os números de vírus encontrados estão demonstrados na figura 10.

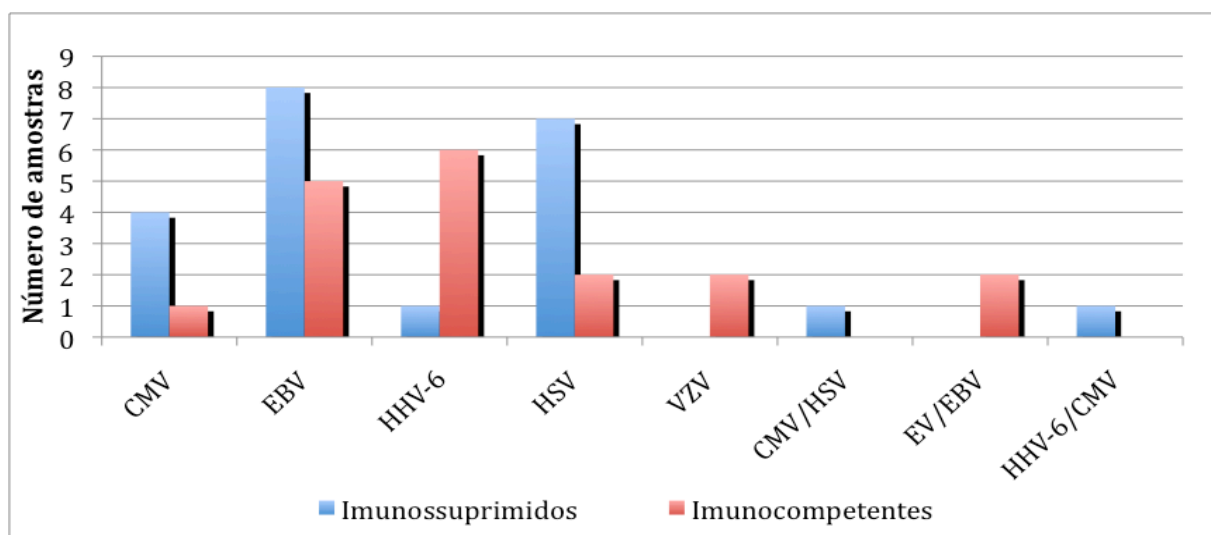


FIGURA 10 – NÚMERO DE CASOS EM QUE FOI ENCONTRADO DNA PARA HERPESVÍRUS EM PACIENTES IMUNOCOMPETENTES (GRUPO I) E IMUNOCOMPROMETIDOS (GRUPO II) (n = 40). FONTE: o autor (2011).

Os dados demográficos, clínicos e epidemiológicos dos pacientes pertencentes aos dois grupos analisados estão listados nas tabela 3. No grupo I, houve um predomínio de pacientes femininas e no grupo II de pacientes masculinos. Em ambos os grupos houve um número semelhante de casos de encefalites e meningoencefalites ($p = 0,53$).

TABELA 3 – DADOS DEMOGRÁFICOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS DOIS GRUPOS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.

Dado	Grupo I (Imunocompetentes)	Grupo II (Imunocomprometidos)	P
N	18	21	
Idade (anos)			$p = 0,07$
Média ± DP	26,5 ± 21,6	35,1 ± 15	
Mediana (IIQ 25-75)	19 (8,5 – 42)	35 (29,5 – 32,5)	
Raça			$p = 1,00$
Branca/Negra	14/1	20/1	
Sexo			$p = 0,11$
Masculino/Feminino	7/11	14/7	
Tempo entre início de sintomas e diagnóstico (dias)			$p = 0,25$
Média ± DP	17,1 ± 23,3	16,5 ± 14,5	
Mediana (IIQ 25-75)	5,5 (2 – 25)	14,5 (7,5 – 19,5)	
Tempo de internamento (dias)			$p = 0,48$
Média ± DP	22,2 ± 19	32 ± 39,1	
Mediana (IIQ 25-75)	22 (3,7 – 35,2)	19 (10,7 – 41,5)	
Comprometimento neurológico	10 encefalite 7 meningite 1 mielite	13 encefalite 8 meningite	$p = 0,53$
Glasgow	N = 8	N = 12	$p = 0,72$
Média ± DP	13,6 ± 1,9	14,3 ± 0,9	
Mediana (IIQ 25-75)	14,5 (11,7 – 15)	15 (14 – 15)	
Óbito	1/18 (5,5%)	4/21 (19%)	$p = 0,37$

FONTE: o autor (2011).

Os sinais e sintomas clínicos dos pacientes dos grupos I e II estão descritos na tabela 4. O sintoma de rigidez de nuca foi percebido mais em pacientes imunocompetentes ($p = 0,14$).

TABELA 4 – SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR HERPESVÍRUS EM SNC.

	Imunocompetentes (n =18)		Imunocomprometidos(n = 21)		<i>p</i>	Total (n = 39)	
	n	%	n	%		n	%
Cefaleia	12	67	15	71	1,00	27	71
Febre	10	55	14	67	0,52	24	63
Vômitos	13	72	10	47	1,00	23	61
Confusão	9	50	11	52	0,19	20	52
Convulsões	7	39	8	38	1,00	15	39
Rigidez de nuca	7	39	3	14	0,14	10	26
Kernig/Brudzinski	1	5	2	9	1,00	3	8
Fotofobia	0	0	3	14	0,23	3	8

FONTE: o autor (2011).

Muitos pacientes com infecções no SNC por herpesvírus apresentavam concomitantemente evidências de infecção sistêmica por esses vírus, como a descrição de *rash* cutâneo em 9,5% (4/42) dos pacientes (HHV-6 n = 1, EBV n = 2, HSV n = 1) e herpes labial e/ou genital em 9,5% (4/42) dos pacientes (HSV/CMV n=1, EBV n=1, HSV n=2). Entre os pacientes que tiveram DNA de CMV detectado no LCR (n = 8), 9,5% (4/42) possuíam evidências de infecção sistêmica confirmada por outros métodos diagnósticos (antigenemia no sangue periférico e detecção de anticorpos específicos no sangue).

Entre os quatro pacientes que evoluíram para o óbito do grupo II, três estavam infectados com HIV, sendo que um foi diagnosticado com neurotoxoplasmose, infecção por CMV e HSV em amostras de LCR coletados em diferentes períodos, outro com HSV e neurocriptococose e o terceiro paciente com encefalite por HHV-6. O quarto paciente desse grupo havia sido submetido a um transplante de medula óssea devido à anemia de Fanconi, estava no 9º mês pós-transplante e apresentou infecção neurológica por CMV. No grupo I, evoluiu para o óbito somente um paciente de 73 anos, do sexo masculino, com diagnóstico de encefalite por HSV.

6.6.1 Pacientes coinfectados com HIV

A maioria dos pacientes imunocomprometidos com a detecção de herpesvírus em LCR tinha o diagnóstico de AIDS (66,7%; 14/21) e 42,8% (6/14) estavam utilizando terapia antiretroviral, porém, a maior parte não apresentava evidências de resposta à terapia antiretroviral específica. Esses pacientes tinham um tempo mediano de diagnóstico do HIV de 7 meses (IIQ 25 – 75, 1 – 102 meses), a carga viral deles tinha um valor mediano de 87.064 cópias/ml (log 4,93), (IIQ 25 – 75, log 4,49 – log 5,35) e a mediana de CD4 era de 93,5 células/ μ L, (IIQ 25 – 75, 31,5 – 282,2). O CD4 nadir dos pacientes com HIV teve uma mediana de 38 células/ μ L (IIQ 25 – 75, 11,5 - 117) (tabela 5).

TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES HIV POSITIVOS COM INFECÇÃO POR HERPESVÍRUS.

Pacientes HIV positivos n = 14(%)	
Em uso TARV	6 (43%)
Homens	10 (71%)
Idade (anos)	
Mediana	36,5
IIQ 25 - 75	31,5 - 42,75
Carga Viral (cópias/ml)	
mediana	87.064
IIQ 25 - 75	30.969 – 226.715
CD4 na internação (células/mm ³)	
mediana	93,50
IIQ 25 – 75	31,5 – 282,2
CD4 Nadir*(células/mm ³)	
Mediana	38
IIQ 25 – 75	11,5 - 117

FONTE: o autor (2011).

NOTA: *CD4 Nadir (n = 13). TARV = terapia antiretroviral.

Dos 14 pacientes HIV positivos 35,7% estavam infectados com EBV, 35,7% com HSV, 14,3% com CMV, 7% com HHV-6, 7% com HHV-6/CMV e 7% com CMV/HSV. Casos concomitantes de neurotoxoplasmose foram vistos em 35,71% (5/14) dos pacientes com AIDS. Infecção por *Cryptococcus sp* no LCR ocorreu em uma paciente com AIDS, com infecção concomitantes por HSV no LCR. Um paciente masculino, com AIDS, de 30 anos de idade, teve o diagnóstico concomitante de HSV no LCR e neurosífilis, tendo evoluído com acidente vascular cerebral (AVC). Outro paciente do sexo masculino, com 48 anos de idade, com *diabetes mellitus*, HIV positivo e linfoma de Hodgkins foi diagnosticado com DNA HHV-6 no LCR.

Entre os pacientes com HIV, 57% (8/14) apresentaram encefalites, sendo 50% (4/8) com EBV detectado no LCR, 25% (2/8) com HSV, 12,5% (1/8) com HSV e CMV em amostras de LCR diferentes e 12,5% (1/8) com HHV-6/CMV na mesma amostra. Apresentaram meningoencefalites 43% (6/14), sendo 16,6% (2/6) com HSV detectado no LCR, 16,6% (1/6) com EBV, 16,6% (1/6) com CMV, 16,6% (1/6) com HHV-6 e 16,6% (1/6) com CMV/HSV (figura 11).

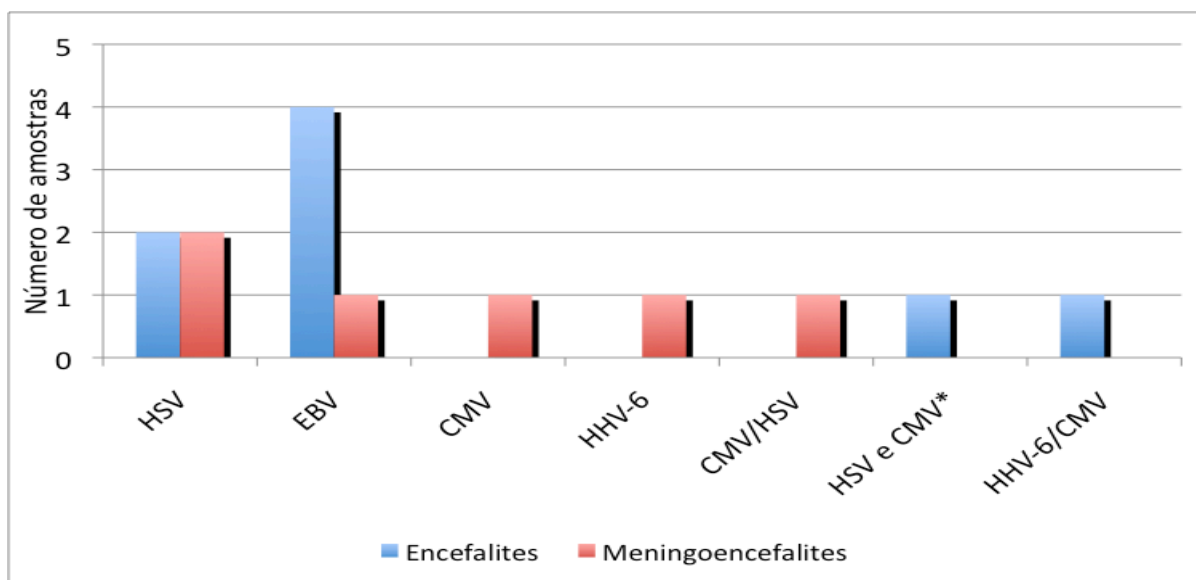


FIGURA 11 – VÍRUS DETECTADOS EM AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES COINFECTADOS COM HIV (n = 14).

NOTA: *Vírus detectados em diferentes amostras de LCR.

FONTE: o autor (2011).

6.6.2 Pacientes com outros fatores de imunossupressão

Entre os demais fatores de imunossupressão, estavam 14,28% (3/21) de pacientes submetidos a TMO. O primeiro, um paciente masculino de 7 anos de idade, foi diagnosticado com EBV no LCR nove meses após o TMO. O segundo, uma paciente feminina, de 11 anos de idade, com CMV no LCR quatro meses após o TMO. O terceiro, um paciente masculino com 15 anos de idade, com CMV no LCR dois meses após o TMO.

Os demais pacientes imunocomprometidos foram uma paciente feminina de 20 anos de idade que foi submetida a um transplante de fígado devido à hepatite autoimune e apresentou infecção por EBV e *Cryptococcus neoformans*. Os outros eram de uma paciente de 77 anos de idade com *diabetes mellitus* e com infecção por HSV. Uma paciente com esclerodermia crescente, com 43 anos de idade, com HSV e *Cryptococcus neoformans* no LCR e um paciente com 35 anos de idade, com carcinoma de nasofaringe metastático, diagnosticado com EBV no LCR. A tabela 6 apresenta todos os pacientes do grupo II, os vírus identificados e também as coinfeções presentes.

TABELA 6 – HERPESVÍRUS DIAGNOSTICADOS EM PACIENTES DO GRUPO II COM DOENÇAS DE BASE E COINFECÇÕES.

Paciente	Doença de Base	Vírus	Coinfecção
2	HIV	EBV	
3	TMO LLA	CMV	
4	HIV	CMV	
5	HIV	CMV/HSV	Neurotoxoplasmose
6	HIV	EBV	
7	HIV	HSV e CMV	Neurotoxoplasmose
11	D.M.	HSV-1	
13	HIV	EBV	
14	HIV	HHV-6/CMV	Neurotoxoplasmose
16	Esclerodermia	HSV	<i>Cryptococcus neoformans</i>
19	HIV	HSV	neurossífilis
20	A. Fanconi TMO	CMV	
21	HIV	EBV	Neurotoxoplasmose
24	HIV/D.M.*	HSV	
29	HIV	HSV	<i>Cryptococcus sp</i>
32	Transp. Fígado	EBV	<i>Cryptococcus neoformans</i>
33	HIV/D.M.* /linfoma de Hodgkins	HHV-6	
34	Carcinoma de Nasofaringe Metastático	EBV	
35	TMO LLA	EBV	
42	HIV	HSV	Neurotoxoplasmose
43	HIV	EBV	

FONTE: o autor (2011).

NOTA: *D.M. = *diabetes mellitus*.

6.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS GRUPOS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES

Apresentavam evidências clínicas e laboratoriais de encefalite 57,5% (23/40) dos pacientes, meningoencefalite 40% (16/40) e mielite por CMV foi diagnosticada em 2,5% (1/40). O EBV foi o mais frequentemente encontrado em pacientes com encefalites, sendo diagnosticado em sete casos. Os demais vírus foram encontrados em percentuais menores, conforme mostra a figura 12. Os dados de cinco pacientes não foram disponibilizados.

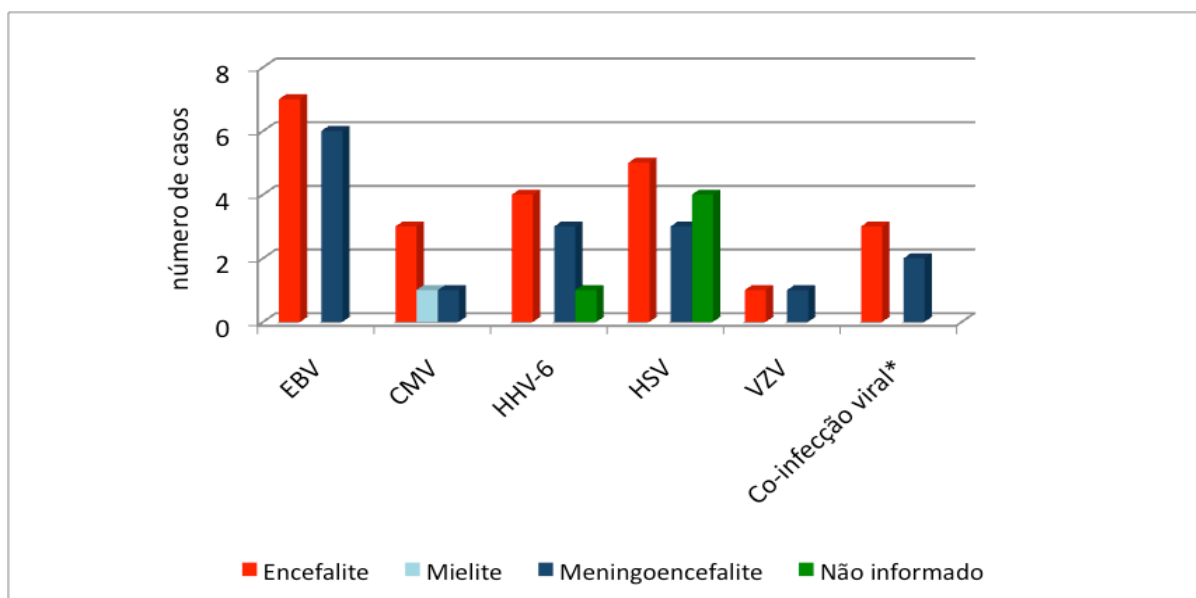


FIGURA 12 – LOCALIZAÇÃO DA INFECÇÃO NEUROLÓGICA POR VÍRUS ENCONTRADO (n = 40).
 FONTE: o autor (2011).

NOTA: $p = 0,9$.

Os dados demográficos clínicos e epidemiológicos de pacientes com encefalites e meningoencefalites estão descritos na tabela 7. Nos dois grupos o predomínio foi de pacientes masculinos.

TABELA 7 – DADOS DEMOGRÁFICOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES COM HERPESVÍRUS IDENTIFICADO NO LCR.

Dado	Encefalites	Meningoencefalite	<i>p</i>
N	23	16	
Idade (anos)			<i>p</i> = 0,30
Média±DP	33 ± 20	25,2 ± 17,5	
Mediana (IIQ 25-75)	32 (15 – 4)	32 (6 – 40,5)	
Raça			<i>p</i> = 1,00
Branca/Negra	21/1	14/1	
Sexo			<i>p</i> = 1,00
Masculino/Feminino	13/10	9/7	
Tempo entre início de sintomas e diagnóstico (dias)			<i>p</i> = 0,45
Média±DP	17,9± 20,25	12,3± 12,15	
Mediana (IIQ 25-75)	9,5 (4,2 – 21,5)	11 (1,25 – 17)	
Tempo de internamento (dias)			<i>p</i> = 0,10
Média±DP	35,5 ± 40	19,57 ± 19,16	
Mediana (IIQ 25-75)	22,5 (14,75 – 43)	12,5 (3 – 36,5)	
Condição imunológica	8 Imunocompetentes 13 Imunossuprimidos	8 Imunocompetentes 8 Imunossuprimidos	<i>p</i> = 0,50
Glasgow	N = 15	N = 7	<i>p</i> = 0,40
Média±DP	10,86 ± 4,7	12,7± 4,3	
Mediana (IIQ 25-75)	13 (8 – 15)	14 (13 – 15)	
Óbito	4/23 (17,4%)	1/16 (6,25%)	<i>p</i> = 0,38

FONTE: o autor (2011).

Um número maior de pacientes com encefalites apresentou cefaleia, embora essa diferença não tenha sido significativa ($p = 0,7$) (tabela 8). Confusão mental e convulsões ocorreram significativamente mais em pacientes com encefalites ($p = 0,05$ e $p = 0,0007$, respectivamente), fotofobia foi vista apenas em pacientes com meningoencefalites ($p = 0,06$).

TABELA 8 – SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES POR HERPESVÍRUS.

	Encefalites (n=23)		Meningoencefalites (n=16)		P
	n	%	n	%	
Cefaléia	17	73	11	68	0,70
Febre	12	52	13	81	0,09
Vômitos	12	52	12	75	0,19
Confusão	15	65	5	31	0,05*
Convulsões	14	60	1	6	0,0007*
Rigidez de nuca	5	21	6	37,5	0,30
Kernig/Brudzinski	2	8	1	6	1,00
Fotofobia	0	0	3	18	0,06

FONTE: o autor (2011).

6.8 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS LCRS POSITIVOS PARA DNA DE HERPESVÍRUS

O número de hemácias foi elevado nas amostras positivas para todos os vírus (EBV 15,7 hemáceas/mm³; HSV 5 hemáceas/mm³; HHV-6 9,65 hemáceas/mm³; CMV 21,2 hemáceas/mm³), mas com valor maior em amostra de LCR positiva para VZV (2760 hemáceas/mm³), embora essa diferença não seja significativa ($p = 0,93$; tabela 9).

A maior mediana de leucócitos foi encontrada em amostras de LCR positivas para HSV (130 leucócitos/mm³), apesar de essa diferença não ter sido significativa ($p = 0,13$). As amostras positivas para EBV, VZV, HHV-6 e CMV tiveram medianas de leucócitos elevadas (15,8; 30,5; 10,5; 33 leucócitos/mm³, respectivamente).

As medianas de ácido láctico foram normais para todos os vírus (EBV 2 mmol/L, HSV 3,45 mmol/L, HHV-6 1,45 mmol/L, CMV 2,45 mmol/L), embora a diferença entre eles seja significativa ($p = 0,02$). O HSV apresentou o nível mais alto de ácido láctico e também o quartil superior acima dos valores normais (figura 13).

TABELA 9 – DADOS BIOQUÍMICOS E CELULARES DAS AMOSTRAS DE LCR POR VÍRUS IDENTIFICADOS (n = 34).

	EBV (n = 12)	VZV (n = 2)	HSV (n = 7)	HHV-6 (n = 8)	CMV (n = 5)	p
Hemáceas/mm ³	15,7 (4,3 -140,5)	2760 (0,6-5520)	5 (3,8-70,3)	9,65 (2,45-143,75)	21,2 (5,90-573,1)	0,93
Leucócitos/mm ³	15,8 (8,18-100,93)	30,5 (11-50)	130 (32,8-215)	10,5 (0,38-48,35)	33 (6,55-60)	0,13
Neutrófilos %	0 (0-0)	0,5 (0-1)	3 (1-10)	1 (0-10)	0 (0-44,5)	0,54
Monócitos %	2,5 (0,25-5,5)	0,5 (0-1)	4 (0-8)	2 (0-12)	2 (0-3)	0,23
Linfócitos %	92,5 (73-96,75)	98,5 (97-100)	91 (76-99)	78,5 (0-86)	96 (6,5-97)	0,43
PT(mg/dL)	93,35 (49-253)	37,5 (20-55)	91 (81,8-151,6)***	37,95 (31,15-134)****	61,3 (43,5-215,4)	0,21
Glicose(mg/dL)	47,5 (35,25-58,25)	53,5 (41-66)	55 (27,-121)	66 (46,75-71)	49 (46,5-57)	0,65
Ácido láctico(mmol/L)**	2 (1,97-3,35)	-	3,45 (2,8-4,1)	1,45 (1,15-1,85)	2,45 (2,4-2,5)	0,02*

FONTE: o autor (2011).

NOTA: **Ácido láctico EBV n = 6, HSV n = 2, HHV-6 n = 6, CMV n = 2; ***1 caso HSV PT suboccipital (91mg/dL); ****1 caso HHV-6 PT suboccipital (320mg/dL). Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil. PT – proteína total.

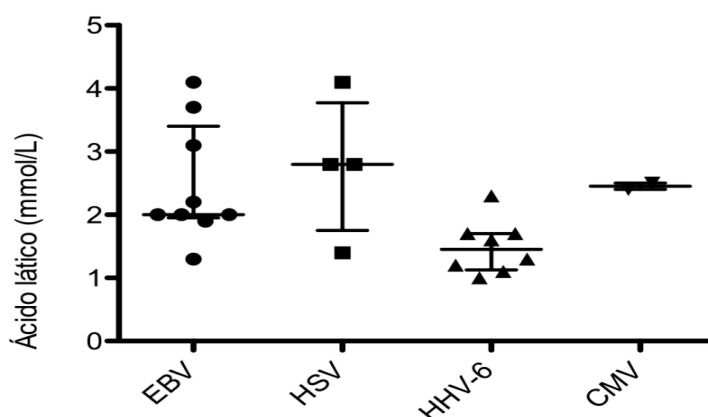


FIGURA 13 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE ÁCIDO LÁTICO ENTRE AMOSTRAS POSITIVAS PARA EBV, HSV, HHV-6 E CMV.

FONTE: o autor (2011).

NOTA: $p = 0,02^*$.

Entre as amostras de LCR submetidas a análises bioquímicas e celulares neste estudo ($n = 40$), 77,5% (31/40) apresentavam glicose dentro dos parâmetros normais (até 39 mg/dL), proteína total (até 44 mg/dL) de 22,5% (9/40), hemácias (sem hemácias presentes) 2,5% (1/40), leucócitos (até 4 leucócitos/mm³) 12,5% (5/40) e ácido lático (abaixo de 3,50 mmol/l) 85% (23/27).

As quatro amostras com coinfeções por dois herpesvírus apresentavam uma mediana significativamente maior de monócitos (7 células/mm³) do que as demais amostras de LCR positivas (2 células/mm³; $p = 0,03$). A mediana de leucócitos foi maior em pacientes com coinfeções de herpesvírus – 54 leucócitos/mm³ (tabela 10).

TABELA 10 – CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUANTITATIVAS EM PACIENTES COM LCR COM COINFECÇÃO POR HERPESVÍRUS E SEM COINFECÇÃO POR HERPESVÍRUS.

	LCR coinfeção (n = 4)		LCR sem coinfeção (n = 36)		p
	Mediana	IIQ (25-75)	Mediana	IIQ (25-75)	
Hemáceas/mm ³	5	2,1-12,6	8,8	3-144	0,27
Leucócitos/mm ³	54	6,27-253	19,5	8,2-96,3	0,80
Neutrófilos %	2,5	1,25-28,5	0,5	0-8	0,14
Monócitos %	7	3,5-9,75	2	0-4	0,03*
Linfócitos %	91	62,5-94	91	69,7-97	0,90
PT(mg/dL)	57	42,6-101,5	82,4***	48,2-156	0,48
Glicose(mg/dL)	54	43-57,5	49,5	41,5-66,7	0,90
Ácido láctico(mmol/L)**	1,9	1,6-2,5	2	1,4-2,8	0,80

FONTE: o autor (2011).

NOTA: ácido láctico **LCR coinfeção n = 3, LCR sem coinfeção n = 24, PT – proteína total; ***1 caso HSV PT suboccipital (91mg/dL) e 1 caso HHV-6 PT suboccipital (320mg/dL).

6.9 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DOS LCRS DOS PACIENTES IMUNOCOMPETENTES (GRUPO I) E IMUNOCOMPROMETIDOS (GRUPO II)

A mediana de proteínas totais foi significativamente maior no LCR dos pacientes imunocomprometidos (128 mg/dL; figura 14; $p = 0,05$) (tabela 11). A mediana de leucócitos foi maior nos imunocompetentes (25,4 leucócitos/mm³), apesar da mediana de linfócitos ter sido maior em pacientes imunocomprometidos (93,5 células/mm³). Ácido láctico apresentou um valor significativamente maior no grupo II (2,8 mmol/L; figura 15; $p = 0,002$), embora os valores tenham sido normais nos dois grupos de pacientes.

TABELA 11 – LCR, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUANTITATIVAS EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.

	Grupo I		Grupo II		
	Imunocompetentes (n = 18)		Imunocomprometidos (n = 20)		
	Mediana	IIQ (25-75)	Mediana	IIQ (25-75)	p
Hemáceas/mm³	11,6	2,1-94,7	8,4	3,2-36,5	0,78
Leucócitos/mm³	25,4	5,97-127	19,5	9,98-94,98	0,86
Neutrófilos %	1,5	0-9,25	0,5	0-2,75	0,43
Monócitos %	2	0-5,75	2	0-5,75	1,00
Linfócitos %	88	67,5-96,25	93,5	74,5-97,75	0,42
PT(mg/dL)	53,5	31,45-83,67	128***	60-207	0,05*
Glicose(mg/dL)	55,5	48,25-65,25	45,5	28,25-66,25	0,17
Ácido láctico(mmol/L)**	1,6	1,3-1,92	2,8	2,22-4	0,002 *

FONTE: o autor (2011).

NOTA: **ácido láctico: imunocompetentes n = 13, imunocomprometidos n = 12. Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil. PT – proteína total. *** 1 caso HSV PT suboccipital (91mg/dL) e 1 caso HHV-6 PT suboccipital (320mg/dL).

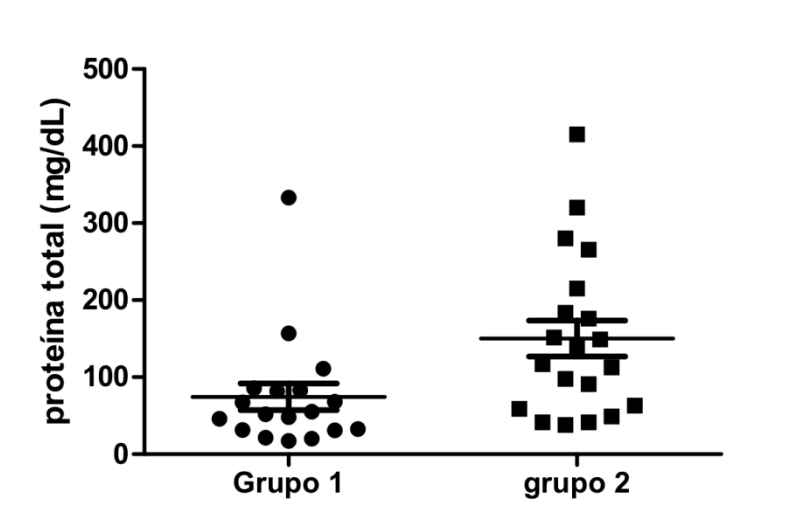


FIGURA 14 – COMPARAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL NO LCR DE PACIENTES DO GRUPO I (IMUNOCOMPETENTES) E GRUPO II (IMUNOCOMPROMETIDOS) DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.

FONTE: o autor (2011).

NOTA: *p* = 0,05*.

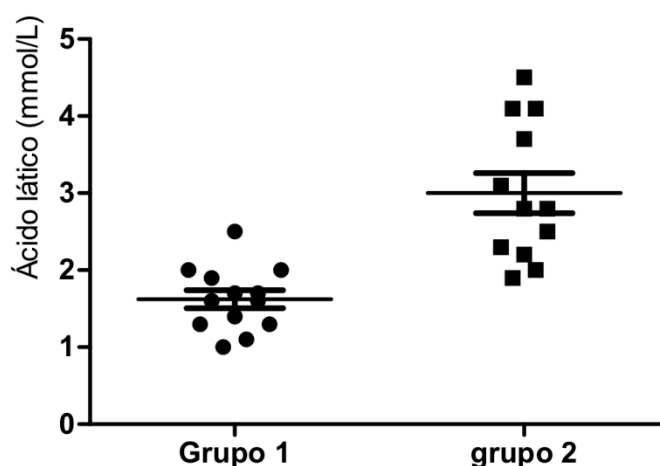


FIGURA 15 – COMPARAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO NO LCR ENTRE PACIENTES DO GRUPO I (IMUNOCOMPETENTES) E GRUPO II (IMUNOCOMPROMETIDOS) DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.

FONTE: o autor (2011).

NOTA: $p = 0,002^*$.

Um número significativamente maior de pacientes imunocomprometidos apresentou taxas de glicose abaixo do normal (40%) com relação aos imunocompetentes (5,5%) ($p = 0,02$). Ácido láctico acima do normal foi encontrado em 33% (4/20) dos pacientes imunocomprometidos e em nenhum paciente imunocompetente, com uma diferença significativa ($p = 0,03$) (tabela 12).

Valores normais de proteínas foram encontrados em 33% (6/18) dos pacientes imunocompetentes e em 15% (3/20) dos pacientes imunocomprometidos ($p = 0,26$). As amostras de LCR coletadas por punção suboccipital (2/45) estavam de 3 a 12 vezes acima do normal.

TABELA 12 – CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES ALTERADAS NO LCR DE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.

	Imunocompetentes n = 18 (%)	Imunocomprometidos n = 20 (%)	P
Glicose (≤ 40 mg/dL)	1 (5,5%)	8 (40%)	0,02*
PT(>45 mg/dL)	12 (66,6%)	17 (85%)***	0,46
Hemácias/mm ³ (>0)	18 (100%)	19 (95%)	1,00
Leucócitos/mm ³ (>4)	15 (83,3%)	19 (95%)	0,32
Acido láctico>3.5mmol/L**	0 (0%)	4 (33%)	0,03*

FONTE: o autor (2011).

NOTA: **ácido láctico imunocompetentes n = 13 e imunocomprometidos n = 12; PT – proteína total;

*** 1 caso HSV PT suboccipital (91mg/dL) e 1 caso HHV-6 PT suboccipital (320mg/dL).

6.10 CARACTERÍSTICAS CITOLOGICAS E BIOQUÍMICAS DO LCR DE PACIENTES COINFECTADOS COM HIV

As características bioquímicas e celulares quantitativas do LCR dos pacientes do grupo II HIV positivos, grupo II HIV negativos e grupo I estão discriminados na tabela 13. Os pacientes do grupo II HIV positivos apresentaram valores maiores de leucócitos (43,7 Leucócitos/mm³), mas essa diferença também não foi significativa ($p = 0,3$). A mediana de proteínas totais foi significativamente maior nos pacientes do grupo II HIV positivos (149 mg/dL; figura 16; $p = 0,01$). Ácido láctico apresentou mediana um pouco acima do normal nos pacientes do grupo II HIV negativos (4,1 mmol/L), com uma diferença significativa dos demais grupos (figura 17; $p = 0,0005$). As nove amostras de LCR com valores de ácido láctico disponíveis dos pacientes do grupo II HIV positivos foram positivas para EBV em 44,44% (4/9), HSV em 11,1% (1/9), CMV em 11,1% (1/9), HHV-6 em 11,1% (1/9), HHV-6/CMV em 11,1% (1/9), HSV e CMV em amostras diferentes em 11,1% (1/9). Nos pacientes do grupo II HIV negativos elas foram positivas para HSV (66,6%; 2/3) e EBV (33,3%, 1/3).

TABELA 13 – LCR, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUANTITATIVAS EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS HIV POSITIVOS, IMUNOCOMPROMETIDOS HIV NEGATIVOS E IMUNOCOMPETENTES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.

	Grupo II HIV positivos n = 13	Grupo II HIV negativos n = 7	Grupo I n = 18	<i>p</i>
Hemáceas/mm ³	5,3 (2,5-19,35)	21,2 (3,8-2240)	11,6 (2,1-94,7)	0,38
Leucócitos/mm ³	43,7 (13,8-116,85)	12 (4,4-32,8)	25,4 (5,97-127)	0,30
Neutrófilos %	1 (0-2,5)	0 (0-10)	1,5 (0-9,25)	0,58
Monócitos %	2 (0-4,5)	4 (0-7)	2 (0-5,75)	0,55
Linfócitos %	94 (89,5-98,5)	74 (0-96)	88 (67,5-96,25)	0,10
PT(mg/dL)	149 (78,4-224,5)****	91 (49-215)***	53,5 (31,45-83,67)	0,01*
Glicose(mg/dL)	45 (29,5-61,5)	56 (19-83)	55,5 (48,2-65,2)	0,27
Ácido lático(mmol/L)**	2,5 (2,1-3,4)	4,1 (2,8-4,1)	1,6 (1,3-1,92)	0,0005*

FONTE: o autor (2011).

NOTA: valores apresentados em mediana e intervalo interquartil(IIQ 25-75); ** ácido lático imunocomprometidos com HIV n = 9, imunocomprometidos sem HIV n = 3, imunocompetentes n = 13, PT – proteína total; ***1 caso HSV PT suboccipital (91mg/dL); ****1 caso HHV-6 PT suboccipital (320mg/dL).

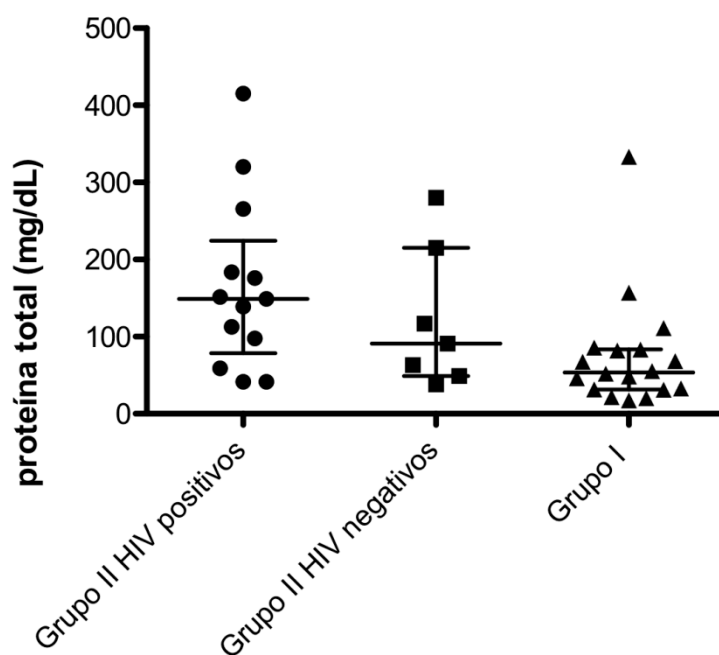


FIGURA 16 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE PROTEÍNA TOTAL (mg/dL) ENCONTRADOS NO LCR DE PACIENTES DO GRUPO II HIV POSITIVOS, GRUPO II HIV NEGATIVOS E GRUPO I DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS (n = 38).

FONTE: o autor (2011).

NOTA: $p = 0,01^*$.

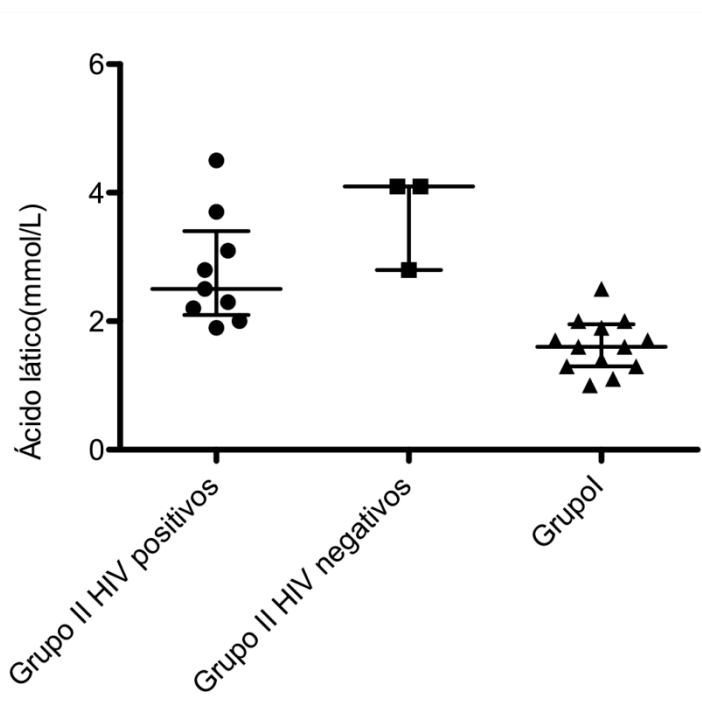


FIGURA 17 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE ÁCIDO LÁCTICO (mmol/L) ENCONTRADOS NO LCR DE PACIENTES DO GRUPO II HIV POSITIVOS, GRUPO II HIV NEGATIVOS E GRUPO I DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS (n = 25).

FONTE: o autor (2011).

NOTA: $p = 0,0005^*$.

6.11 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DO LCR NOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ENCEFALITES E MENINGITES

As características bioquímicas e celulares quantitativas do LCR de pacientes com encefalites, meningoencefalites e mielite estão apresentadas na tabela 14. A mediana de leucócitos nos pacientes com meningoencefalite (73 leucócitos/mm³) foi significativamente maior do que nos pacientes com encefalites (11,45 leucócitos/mm³; figura 18; $p = 0,008$). A mediana de proteínas totais apresentou uma tendência a ser maior em pacientes com meningoencefalite (104,45 mg/dL; figura 19; $p = 0,08$). Apresentaram valores normais de proteínas 27% (6/22) dos pacientes com encefalites e 12,5% (2/16) dos pacientes com meningoencefalites ($p = 0,42$). Os demais valores bioquímicos e celulares foram semelhantes entre os grupos estudados.

TABELA 14 – LCR, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUANTITATIVAS EM PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.

	Encefalite (n = 22)		Meningoencefalite (n = 16)		Mielite (n = 1)	<i>P</i>
	Mediana	IIQ (25-75)	Mediana	IIQ (25-75)	Valor absoluto	
Hemáceas/mm ³	8,1	3 - 192,3	11,9	1,9 - 23,85	1105	0,46
Leucócitos/mm³	11,45	5,3 - 54,7	73	23-143,5	33	0,008*
Neutrófilos %	1	0 - 6	1	0 - 10,75	2	0,91
Monócitos %	1,5	0 - 5,25	2	0,25 - 7,75	2	0,45
Linfócitos %	89,5	9,75 - 94,5	94	78,25-98	96	0,12
PT(mg/dL)	62,15	41,45 - 113,78	104,45***	56-171,25	333	0,08
Glicose(mg/dL)	55,5	40,00 - 72,25	49	43,5-62,75	50	0,66
Ácido láctico(mol/L)**	1,9	1,35 - 2,8	2	1,75-3,1	—	0,52

FONTE: o autor (2011).

NOTA: **Ácido láctico encefalite n = 13, meningoencefalite n = 13, *p* se refere à encefalite e meningoencefalite; ***1 caso HSV PT suboccipital (91mg/dL) e 1 caso HHV-6 PT suboccipital (320mg/dL).

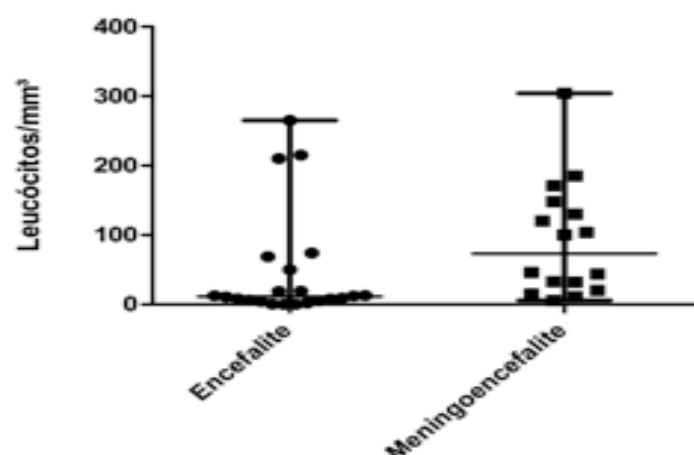


FIGURA 18 – COMPARAÇÃO DE LEUCÓCITOS DO LCR DE PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS (n = 38).

FONTE: o autor (2011).

NOTA: $p = 0,008^*$.

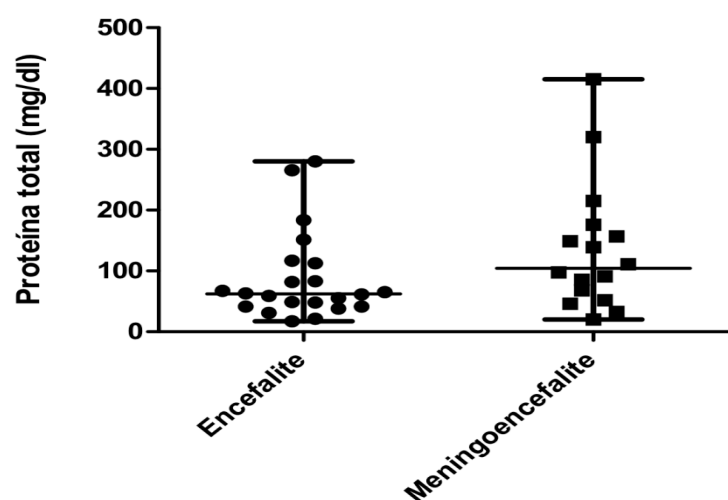


FIGURA 19 – COMPARAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NO LCR DE PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS (n = 38).

FONTE: o autor (2011).

NOTA: $p = 0,08$.

Um número maior de pacientes com encefalites apresentou glicose baixa no LCR (27%), embora essa diferença não seja significativa ($p = 0,7$). Não houve diferença significativa no número de pacientes com proteína total, hemáceas e leucócitos alterados nos pacientes com encefalites e meningoencefalites (tabela 15).

TABELA 15 – LCR, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E CELULARES QUALITATIVAS ALTERADAS EM PACIENTES COM ENCEFALITES E MENINGOENCEFALITES DIAGNOSTICADOS COM HERPESVÍRUS.

	Encefalites n = 22 (%)	Meningoencefalites n = 16 (%)	<i>P</i>
Glicose (≤ 40 mg/dL)	6(27%)	3(19%)	0,70
PT (>45 mg/dL)	15(68%)	14(87%)***	0,25
Hemácias/mm ³ (>0)	22(100%)	15(94%)	0,42
Leucócitos/mm ³ (>4)	18(82%)	16(100%)	0,12
Acido láctico >3.5 mmol/L **	1(4,5%)	2(12%)	0,56

FONTE: o autor (2011).

NOTA: **ácido láctico encefalites n = 13 e imunocomprometidos n = 13, PT – proteína total; ***1 caso HSV PT suboccipital (91mg/dL) e 1 caso HHV-6 PT suboccipital (320mg/dL).

7 DISCUSSÃO

Infecções neurológicas por agentes da família herpesvírus podem apresentar evolução rápida, com graves sequelas e, em alguns casos, fatais. Também podem ser marcadores da presença de uma imunossupressão severa em algumas situações. Dependendo do agente etiológico, a introdução imediata da terapia antiviral específica pode prevenir a evolução com sequelas, diminuir a morbidade e a mortalidade. A identificação etiológica baseada nos dados clínicos e epidemiológicos pode ser errática e retardar o início da terapia, com graves consequências para os pacientes. Por tais razões, a realização de pesquisas buscando o desenvolvimento e padronização de metodologias rápidas, específicas e de alta sensibilidade têm sido uma prioridade. Este estudo foi desenhado tendo como objetivos padronizar e analisar a metodologia molecular diagnóstica disponível no HC-UFPR para a detecção de herpesvírus em pacientes com infecções no sistema nervoso central, além de compreender a extensão e a gravidade dessas infecções dentro do perfil de pacientes atendidos nos serviços especializados dessa instituição.

Desde 1990, várias metodologias para a amplificação e detecção do DNA dos vírus da família *Herpesviridae* foram desenvolvidas (WOLINSKY; ANDERSSON; ROWLEY, 1990). O gene do DNA polimerase é altamente conservado e homólogo no grupo dos herpesvírus (ROZENBERG; LEBON, 1991; JOHNSON *et al.*, 2000; MINJOLLE *et al.*, 2002;). Kouzarides *et al.* (1987) estudaram o gene da polimerase do CMV e verificaram que ele estava relacionado ao gene da polimerase de outros herpesvírus. Posteriormente, VanDevanter *et al.* (1996) desenvolveram uma metodologia de PCR consenso para detectar 22 espécies de herpesvírus compostas por 8 herpesvírus humanos e 14 herpesvírus animais. Eles propuseram o gene da polimerase como um alvo adequado para a detecção e identificação dos herpesvírus em amostras clínicas, por ser um gene conservado e homólogo para todos os herpesvírus (SANKUNTAW *et al.*, 2011).

Os iniciadores utilizados na metodologia de *nested* PCR exposta por Casas *et al.* (1997) foram descritos pela primeira vez no trabalho de Tenório *et al.* (1993). Na primeira amplificação, os oligonucleotídeos iniciadores se alinham à terminação 3' de regiões consenso e nas regiões 5' com as sequências não relacionadas de cada herpesvírus a ser amplificado. Os fragmentos específicos obtidos são o

substrato para a segunda reação *nested*, na qual os iniciadores foram desenhados para produzir diferentes tamanhos de fragmentos para cada vírus.

Os oligonucleotídeos iniciadores, desenvolvidos por Johnson *et al.* (2000), foram sintetizados baseando-se no alinhamento de sequências do gene da DNA polimerase dos oito herpesvírus humanos conhecidos. Foram criados dois pares de iniciadores de acordo com as homologias encontradas, sendo o par de iniciadores HSV-P1 e HSV-P2 utilizados para amplificar HSV-1, HSV-2, EBV, CMV e HHV-8 e o par de iniciadores VZV-P1 e VZV-P2, utilizados para amplificar VZV, HHV-6 (A e B) e HHV-7.

Estudos confirmam que o uso de oligonucleotídeos iniciadores consenso tem uma sensibilidade maior do que iniciadores vírus-específicos (MINJOLLE *et al.*, 1999; TAFRESHI *et al.*, 2005). Neste estudo compararam-se técnicas que utilizam distintos iniciadores que têm como alvo genes, os quais codificam o DNA polimerase viral.

A metodologia de *nested* PCR, quando comparada com a técnica de restrição enzimática aplicada neste trabalho, apresentou uma positividade maior em pacientes que possuíam suspeitas clínicas e laboratoriais de infecções virais no SNC. Por esse motivo, essa foi a técnica escolhida para a análise comparativa dos dados bioquímicos e celulares do LCR e também para a análise das características demográficas e clínicas. A maior positividade da técnica de *nested* PCR tem sido relatada em diversos estudos (CINQUE *et al.*, 1996b; CHESKY *et al.*, 2000; STUDAHL *et al.*, 2000), pois, ao submeter o material a um segundo ciclo de PCR, obtém-se um aumento significativo na quantidade do DNA alvo, o que possibilita a detecção de material genético mesmo quando em quantidades muito pequenas.

Alguns interferentes devem ser levados em consideração ao se definir a utilização da reação de *nested* PCR como uma metodologia diagnóstica, entre eles, o risco de contaminação pela manipulação do material amplificado no primeiro PCR, além do maior tempo de execução e maior custo por reação, pois cada vírus deve ser investigado separadamente. Por tais motivos, optou-se por analisar o desempenho da metodologia de PCR seguida por digestão enzimática no diagnóstico de herpesvírus em SNC. Essa técnica baseia-se em uma única amplificação, seguida de digestão enzimática do produto amplificado, com consequente identificação do tipo de vírus. Trata-se de uma técnica mais rápida, com menor manipulação de amostra e de menor custo de execução. Provavelmente,

a baixa carga viral presente no LCR pode ter influenciado na menor detecção de DNA pela metodologia de PCR seguida por digestão com enzima de restrição. Além disso, essa metodologia depende de um técnico experiente para a interpretação do padrão de corte do DNA pelas enzimas de restrição em gel de agarose. Como o desempenho dessa técnica ficou muito abaixo do observado com a *nested* PCR, optou-se pela descontinuidade de sua utilização no serviço.

No presente estudo, 4,7% (48/1010) dos vírus da família *Herpesviridae* foram identificados. Outros autores apresentam distintos percentuais de positividade em suas análises, entre eles, Davies *et al.* (2005), que encontraram uma positividade de 7,03% utilizando *multiplex* PCR seguida de hibridização com sondas oligonucleotídicas específicas em pacientes com suspeita de infecção viral no SNC. Studahl *et al.* (2000) encontraram uma positividade de 10,40% em pacientes com suspeita de etiologia viral relacionada aos sintomas neurológicos. Foi utilizado *nested* PCR com oligonucleotídeos iniciadores, que se anelavam a regiões vírus específicas e Mendoza *et al.* (2007), tendo como critério de inclusão amostras de pacientes com sintomas sugestivos de infecção no SNC, relataram uma positividade de 12,00% no estado de São Paulo, Brasil, utilizando a técnica de *multiplex* PCR com oligonucleotídeos iniciadores vírus-específicos.

O menor percentual de positividade observada na população estudada levou a uma análise sobre os fatores interferentes que poderiam estar contribuindo para esse achado. Desde a implantação dessa metodologia no Serviço de Virologia do HC-UFPR, foram tomados cuidados pré-analíticos no encaminhamento das amostras ao laboratório para se evitar contaminação e degradação do material, os quais podem levar a resultados falso-positivos e falso-negativos. Amostras de LCR somente eram aceitas quando coletadas em tubos novos, livres de RNAses e DNAses, esterilizados e encaminhados em gelo reciclável. O material era processado imediatamente ou mantido em freezer a -20°C por no máximo até 5 dias até serem processados.

Outro fator analisado foi o intervalo de tempo entre o início dos sintomas e a coleta do material. No presente estudo, esse intervalo teve uma mediana elevada, sendo que obteve-se maior número de amostras positivas quando essas foram coletadas nos primeiros dias após o início dos sintomas. A partir do trigésimo dia após o início dos sintomas, a positividade diminuiu de forma importante.

O tempo entre o início dos sintomas e a coleta do LCR é um ponto crítico para o sucesso da detecção do vírus (ABERLE; PUCHHAMMER-STÖCKL, 2002). O diagnóstico precoce da encefalite por HSV é importante para se evitar morbidade e mortalidade (TYLER, 2004). Neste estudo, as amostras positivas para HSV foram coletadas tardiamente, o que pode ter contribuído para um pior prognóstico dos pacientes. O teste da PCR no LCR tende a tornar-se negativo ao longo do tempo, especialmente em pacientes imunocompetentes (HAANPAA *et al.*, 1998). Segundo Weber *et al.* (1996), resultados positivos podem persistir por 2-4 semanas após o início da doença, dependendo do vírus e do início do tratamento. No estudo de Aurelius e Johansson (1991), o resultado do PCR permaneceu positivo em amostras testadas 27 dias após o início dos sintomas neurológicos.

De uma forma paradoxal, amostras colhidas muito cedo, nas primeiras 48 horas do curso da doença, podem não conter material devido à baixa replicação viral (ABERLE; PUCHHAMMER-STÖCKL, 2002), devendo-se ressaltar a importância de nova punção líquórica em casos inicialmente negativos com alta suspeição clínica.

Outro interferente que, necessariamente, deve ser analisado nesses casos é a presença da hemoglobina. Ela é frequente em casos de encefalites e meningoencefalites causadas por HSV devido a lesões hemorrágicas (AL-SHEKHLEE; KOCHARIAN; SUAREZ, 2006). A presença de hemácias nas amostras de LCR na ausência de punção traumática é descrita em 25% a 40% dos casos (FISHMAN, 1992), variando de 12 a 4000 hemácias/mm³ nos casos de encefalite por HSV.

A hemoglobina no LCR tem sido referida como um fator inibitório de PCR (DEBIASI; TYLER, 1999). Contudo, no presente estudo, as concentrações de hemácias nas amostras de LCR com resultados positivos e negativos não possuíam valores significativamente diferentes. Portanto, esse não foi um fator limitante para a metodologia de PCR empregada. Isso pode ter ocorrido devido à eficiente purificação do DNA pela metodologia aplicada neste trabalho, removendo constituintes do sangue que são relacionados com inibição da PCR.

Em outro estudo, realizado por Almeida *et al.* (2010) no laboratório de virologia do HC-UFPR, para a pesquisa de enterovírus em pacientes com quadros de meningites virais, as amostras de LCR com resultados negativos (n = 399) apresentaram um maior número de hemácias (média de 580 ± 2890 cel/mm³) quando comparadas com as amostras com resultados positivos (n = 49; média de

hemáceas de $36,9 \pm 183 \text{ cel/mm}^3$; $p = 0,007$). Deve-se ressaltar que esses vírus são tipo RNA, os quais são previamente submetidos à transcrição reversa para formar o DNA complementar (cDNA) e posterior realização de PCR. A hemácia pode atuar como um fator de inibição por influenciar na síntese do cDNA ou, no sangue, podem existir outros interferentes que levem a uma rápida degradação do RNA (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Deve-se ressaltar que, entre as 1.010 amostras analisadas no presente estudo, 460 foram submetidas a um estudo paralelo para pesquisar a presença de enterovírus, em que foram encontradas 10,65% (49/460) de amostras positivas entre os anos de 2005 e 2006 (VIDAL *et al.*, 2011). Logo, outros agentes etiológicos são frequentemente relacionados a encefalites e meningoencefalites virais no Brasil (VIDAL *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2011).

Dessa forma, ao se comparar em termos percentuais esses resultados com os encontrados por outros autores, deve-se levar em conta os agentes etiológicos que foram incluídos na pesquisa, além da metodologia empregada, pois a utilização de distintas metodologias pode ter influenciado nas diferentes positivities encontradas por vários autores.

Os perfis de vírus encontrados no presente estudo foram similares aos previamente publicados. Entre as amostras positivas, os vírus mais frequentemente encontrados foram HSV (28%) e EBV (28%), seguidos de HHV-6, CMV e VZV (17%, 13%, 4%, respectivamente).

Studahl *et al.* (2000) estudaram a presença de CMV, EBV, HHV-6, HSV e VZV em amostras de LCR de pacientes com suspeitas de etiologia viral para os sintomas neurológicos (87% eram imunocompetentes). Foi encontrado DNA de vírus da família *Herpesviridae* pela metodologia de *nested* PCR em 10,4% das amostras de LCR (69/662). HSV foi detectado em 40,6% (28/69), EBV em 30,4% (21/69), CMV 14,4% (10/69), HHV-6 em 8,7% (6/69) e VZV em 8,7% (6/69). Semelhante ao nosso estudo, HSV foi detectado em um maior número de amostras seguido por EBV. CMV foi encontrado em porcentagens similares.

No estudo de Davies *et al.* (2005), 7,00% (53/753) das amostras de LCR de pacientes com ou sem apresentações clínicas de infecção no SNC foram positivas para cinco diferentes vírus da família *Herpesviridae* pela metodologia de *multiplex* PCR seguida por hibridização com sondas de oligonucleotídeos. Entre as amostras positivas, 34% (18/53) eram EBV, 32% (17/53) HSV, 17% (9/53) HHV-6, 11,3%

(6/53) CMV, 5,6% (3/53) VZV e 85% eram imunocompetentes. Os perfis dos vírus encontrados foram semelhantes ao nosso estudo, em que HSV e EBV representaram a maior porcentagem de vírus encontrados seguidos por HHV-6, CMV e VZV com porcentagens muito próximas em ambos os estudos.

O HC-UFPR é um hospital terciário que inclui a maioria das especialidades da clínica médica e cirúrgica, serviço de TMO, transplante hepático, unidade de terapia intensiva (UTI) de adulto (clínica e cirúrgica), UTI neonatal, UTI pediátrica, serviço de pronto atendimento e emergência de adultos e pediátrico, quimioterapia de alto risco, infectologia de adulto e pediátrica, ginecologia e obstetrícia (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008). O número elevado de casos com imunocomprometimento e a frequência de vírus da família *Herpesviridae* encontrada neste estudo podem ter sido influenciados pelo perfil dos pacientes atendidos na instituição.

No grupo de pacientes imunocompetentes, os vírus mais frequentes foram HHV-6 (33%; 6/18) e EBV (28%; 5/18). Porém, outros autores relatam o HSV como o agente etiológico mais frequente em imunocompetentes (STUDAHN *et al.*, 2000; RANTALAIHO *et al.*, 2001).

Três pacientes imunocompetentes com HHV-6 (50%; 3/6) eram crianças com menos de 12 anos de idade. Infecções primárias por HHV-6 ocorrem cedo na vida, com doenças associadas variando de infecções assintomáticas a doenças disseminadas fatais (SCHLEISS, 2009). Studahn *et al.* (2006) estudaram 662 pacientes com suspeita de etiologia viral relacionada aos sintomas neurológicos, sendo que 69 pacientes foram PCR positivos para seis diferentes herpesvírus. Seis pacientes imunocompetentes (8,69% – 6/69, idade mediana 25,8 anos, variando entre 8 meses a 72 anos) eram HHV-6 positivos no LCR e não houve casos em pacientes imunocomprometidos.

Aberle e Puchhammer-Stöckl (2002) realizaram PCR em tempo real em 576 amostras de LCR de pacientes com suspeitas de infecções por herpesvírus no SNC e identificaram DNA de HHV-6 apenas no LCR de crianças (0,90%; 5/576). Segundo Caserta *et al.* (1994), o HHV-6 pode invadir e persistir no SNC de uma proporção substancial de crianças imunocompetentes com menos de 3 anos de idade, embora a significância da sua presença no LCR em relação ao potencial neuropatológico não seja clara.

Mais da metade dos pacientes (54%) com DNA de herpesvírus positivo no presente estudo eram imunocomprometidos. Um número maior de pacientes imunocomprometidos foi diagnosticado com EBV (38%), sendo esse patógeno frequentemente detectado em pacientes imunocomprometidos. No estudo de Hanson *et al.* (2007), todos os pacientes com DNA de EBV, presente no LCR (2,6%; 12/457) a partir de testes executados utilizando a técnica de *real time* PCR, eram imunocomprometidos (pacientes HIV positivos ou receptores de transplantes de órgãos sólidos ou de células-tronco). Aberle e Puchhammer-Stöckl (2002), de 1995 a 2001, avaliaram a presença de herpesvírus em amostras de LCR de pacientes com suspeita de infecção por herpesvírus no SNC por testes quantitativos de PCR, em que o EBV foi detectado principalmente em pacientes com HIV.

Neste estudo, o CMV foi diagnosticado em maior número em pacientes imunocomprometidos (18,20%; 4/22) e em apenas um paciente imunocompetente (5,50%; 1/18). No estudo de Aberle e Puchhammer-Stöckl (2002), o CMV foi identificado no LCR de 7,1% (41/576) dos pacientes com suspeita clínica de infecção por herpesvírus no SNC. A maioria dos pacientes com CMV no LCR eram imunocomprometidos. Encefalopatias em pacientes com HIV foram relacionados ao CMV em 81,81% (9/11).

Infecções concomitantes por mais de um herpesvírus no SNC são comumente relatadas. Neste estudo, coinfeções por CMV/HSV e CMV/HHV6 foram encontradas nos pacientes imunocomprometidos e dois casos de coinfeção EV/EBV entre os pacientes imunocompetentes. No estudo de Chesky *et al.* (2000), CMV e EBV foram encontrados por *nested* PCR em uma mesma amostra de LCR, representando 3,2% (1/31) das amostras positivas. Esse paciente estava infectado com HIV, foi diagnosticado clinicamente com encefalite e possuía cultura positiva no LCR para *Mycobacterium tuberculosis*.

Weinberg *et al.* (2005) detectaram EBV em 39 amostras de LCR de pacientes com indicação clínica de infecções no SNC. Entre os imunocomprometidos, 3/10 pacientes estavam coinfectados com EBV/CMV e 2/10 com EBV/VZV. No estudo de Rojanawiwat *et al.* (2005), em 4% (6/140) dos pacientes infectados com HIV apresentando sintomas no SNC, EBV e CMV foram detectados na mesma amostra de LCR pela metodologia de *nested* PCR. De acordo com esses pesquisadores, uma associação significativa da detecção do EBV com uma contagem elevada de células no LCR pode ser decorrente da contaminação do

LCR com sangue, o qual pode estar positivo para EBV, contudo, o EBV também tem sido frequentemente detectado em pacientes com células no LCR normais.

Studahl *et al.* (2000) detectaram coinfeções de herpesvírus no SNC por *nested* PCR em 7,2% (5/69) dos pacientes. CMV/EBV foi diagnosticado em um paciente imunocomprometido, devido à infecção por HIV (11%; 1/9), e em pacientes imunocompetentes foram detectados VZV/HHV-6 (1,6%; 1/60), HSV-1/EBV (1,6%; 1/60) e VZV-EBV (3,33%; 2/60). O EBV foi o vírus mais presente em infecções duplas. Os autores afirmam que as consequências dessas infecções virais são desconhecidas, mas que a detecção de EBV em pacientes com encefalites por HSV pode estar correlacionada com um prognóstico ruim.

No presente estudo, foi encontrado CMV e HSV em uma amostra no grupo de imunossuprimidos. Laskin, Stahl-Bayliss e Morgello (1987) relataram três pacientes com AIDS, com infecções combinadas com CMV e HSV no SNC. Todos tiveram ventriculite e encefalite difusa documentadas em autópsia. A presença de HSV-1 e CMV foi confirmada microscopicamente com imuno-histoquímica. Segundo os estudiosos, esses casos parecem indicar que infecções concomitantes por CMV e HSV no SNC não são raras em pacientes com AIDS (LASKIN; STAHL-BAYLISS; MORGELLO, 1987).

No estudo de Davies *et al.* (2005), múltiplos vírus foram detectados em 2% das amostras de LCR positivas analisadas por PCR *multiplex* seguida por hibridização de sondas oligonucleotídicas. As coinfeções foram de EBV/VZV, EV/HHV-6, HSV-1/CMV/VZV, HSV-1/EBV, HSV-2/EV, EBV/HHV-6 e EBV/CMV.

Alguns autores defendem a hipótese de que a intensidade da resposta inflamatória causada pela infecção com o primeiro agente no SNC possa desencadear a reativação dos herpesvírus que estejam latentes no SNC ou nos linfócitos que atravessaram a barreira hematoencefálica (VINTERS; WANG; WILEY, 1993; SANDERS *et al.*, 1996; WEINBERG *et al.*, 2005). É importante reconhecer que infecções duplas no SNC são comuns e que a identificação de herpesvírus no LCR não exclui a realização de testes para um segundo agente etiológico potencialmente tratável (WEINBERG *et al.*, 2005).

No presente estudo, o maior número de pacientes com infecções por herpesvírus no LCR foi entre as idades de 31 a 50 anos, sendo EBV o mais frequentemente identificado (38,88%; 7/18 pacientes). Rojanawiwat *et al.* (2005) constataram que pacientes HIV positivos com EBV no LCR tendem a ser mais

velhos que os demais. No estudo de Studahl *et al.* (2000), a distribuição da idade dos pacientes com DNA de herpesvírus positivos no LCR mostrou três picos: 0-15 anos, 25-35 anos e 65-75 anos. HSV, CMV e HHV-6 foram encontrados em crianças e adultos, assim como em outro estudo (STUDAHN *et al.*, 2000; DAVIES *et al.*, 2005).

Não houve relação da distribuição de herpesvírus dos casos por índice pluviométrico ou temperatura na cidade de Curitiba, no período estudado. Esse resultado é semelhante ao relatado por estudos anteriores (WHITLEY *et al.*, 1982; TYLER, 2004), demonstrando que as infecções por esses vírus estão mais relacionadas com características imunológicas do indivíduo do que com o comportamento sazonal desses patógenos. De forma similar ao previamente publicado, também não foi observada uma distribuição diferenciada por gênero nessas infecções (WHITLEY *et al.*, 1982; TYLER, 2004).

Neste estudo, o maior número de óbitos foi observado em pacientes infectados com HSV (25,00%; 2/8). Rantalaiho *et al.* (2001) estudaram todos os pacientes adultos com encefalites agudas (n = 322), em um período de 25 anos, e a taxa de mortalidade dos pacientes diagnosticados com encefalites por HSV foi de 15,09% (8/53), sendo também o agente etiológico relacionado ao maior número de óbitos. Deve-se ressaltar que a distinção entre encefalite e meningoencefalite baseou-se na descrição médica dos achados neurológicos e na análise das características celulares e bioquímicas do LCR. No entanto, é importante destacar que pacientes imunossuprimidos podem apresentar LCR com celularidade e bioquímica sem alterações.

A maioria dos pacientes desta pesquisa apresentava evidências clínicas e laboratoriais de encefalite (51%). HSV foi mais frequentemente relacionada a encefalites (21,73%; 5/23 casos de encefalites). Aberle e Puchhammer-Stöckl (2002) verificaram que a maioria dos pacientes positivos para HSV-1 no LCR apresentou encefalite focal e, em raros casos, meningites (78% no total). HSV-2 foi detectado na maioria dos casos em pacientes adultos com meningites ou encefalites (77%). Calvario *et al.* (2002) identificaram um maior número de pacientes com encefalites por HSV, 26,66% (4/15), do que meningoencefalites, 20% (3/15).

A presença de VZV relacionada a encefalites (4,34%; 1/23 casos) e meningoencefalites (6,25%; 1/16 casos) observada não foi correlacionada com o diagnóstico de herpes zoster. Diferente do que foi relatado por Aberle e

Puchhammer-Stöckl (2002), que associaram a presença de VZV no LCR aos sintomas do herpes-zoster.

CMV estava relacionado com mais casos de encefalite (13,04%; 3/23) do que meningoencefalites (6,25%; 1/16). Calvario *et al.* (2002) detectaram DNA de CMV em 12 pacientes e 33,33% (4/12) foram diagnosticados com encefalites. Em nenhum caso o CMV estava relacionado a meningoencefalite.

Calvario *et al.* (2002) identificaram DNA de CMV/HHV-6 em amostra de LCR de um paciente com meningoencefalite. No presente estudo, DNA de CMV/HHV-6 estava relacionado a um caso de encefalite.

Neste estudo, cinco pacientes imunocomprometidos EBV positivos no LCR eram portadores do vírus HIV. Corcoran *et al.* (2008) realizaram testes de carga viral de EBV em amostras de LCR de 55 pacientes infectados com HIV, que apresentavam diferentes doenças do SNC, e 36,36% (20/55) dos pacientes apresentaram EBV detectável no LCR, incluindo um paciente com leucoencefalopatia multifocal progressiva e outro com toxoplasmose. Um dos pacientes, no presente estudo, com resultado de EBV positivo no LCR, era um homem de 33 anos de idade, diagnosticado com leucoencefalopatia multifocal progressiva e também neurotoxoplasmose.

Dos 14 pacientes com AIDS relatados nesta pesquisa, oito não estavam em uso de terapia antiretroviral ou estavam com má adesão. Segundo Ferrando e Freyberg (2008), hospitalizações e infecções por vírus da família *Herpesviridae* no SNC, em tempos de tratamento com terapia *HAART*, ocorrem devido a limitações no acesso a cuidados, má adesão ao tratamento antiretroviral e ao deslocamento demográfico da epidemia do HIV.

Discute-se a importância desse achado em pacientes imunossuprimidos, nos quais a reativação viral assintomática pode ocorrer. Nos pacientes analisados neste estudo, observou-se que a imunossupressão era grave em grande parte dos casos, sendo que múltiplas infecções do SNC podem ocorrer e a distinção entre o principal agente causador da sintomatologia torna-se impossível. Na maioria dos casos, opta-se pelo tratamento de todos os patógenos, desde que haja medicação específica disponível.

Neste estudo, cefaleias, febre, vômitos e convulsões foram frequentes em pacientes com encefalites. Whitley *et al.* (1982) descreveram cefaleia em 81%, febre

em 90%, vômitos em 46% e convulsões em 84,95% dos pacientes com encefalites por HSV comprovadas por biópsia.

Rigidez de nuca ocorreu mais em pacientes imunocompetentes (39%; 7/18) do que em imunocomprometidos (14%; 3/21). A rigidez de nuca ocorre devido à inflamação das meninges, estando relacionada a um aumento no número de leucócitos. Nesses pacientes imunocompetentes, o número de leucócitos foi maior do que nos imunocomprometidos (mediana de 25,40 e 19,50, respectivamente), estando de acordo com o achado clínico de rigidez de nuca.

Todas as amostras de LCR positivas para os vírus incluídos neste estudo apresentaram valores aumentados de leucócitos. Os pacientes HSV positivos apresentaram uma mediana de leucócitos até quatro vezes maior do que os pacientes diagnosticados com outros vírus (130 leucócitos/mm³), embora essa diferença não tenha sido significativa. Pleocitose, à custa de linfócitos, é frequentemente observada em pacientes com encefalite por HSV (AL-SHEKHLEE; KOCHARIAN; SUAREZ, 2006; GILDEN *et al.*, 2007).

A mediana de leucócitos nos pacientes com meningoencefalite (73,00 leucócitos/mm³; IIQ 23-143,5 leucócitos/mm³) foi significativamente maior do que nos pacientes com encefalites (11,45 leucócitos/mm³; IIQ 5,3-54,7 leucócitos/mm³; $p = 0,008$), embora os pacientes com encefalites também tenham apresentado mediana de leucócitos aumentada. No estudo de Simko *et al.* (2002), a presença de leucócitos no LCR foi mais pronunciada em casos de meningites por HSV do que nos casos de encefalites por HSV. Os pacientes com encefalites apresentaram média de 202 células/mm³ (variando de 2-667 células/mm³), enquanto a média de leucócitos nos pacientes com meningites por HSV foi de 484 células/mm³ ($p=0,004$).

Na encefalite por HSV, os achados de LCR são inespecíficos e similares em pacientes confirmados e naqueles com doenças que mimetizam a encefalite herpética. A presença de hemácias não é diagnóstica. Aproximadamente 5 a 10% apresentam LCR normal na primeira avaliação. A proteína total geralmente está aumentada no primeiro exame de LCR, entre 50 a 90 mg/dL, porém, pode estar normal em 25% dos casos (FISHMAN, 1992).

Tanto os pacientes imunocompetentes quanto os imunocomprometidos apresentaram valores elevados de leucócitos, um pouco maior nos imunocompetentes, sem diferença significativa ($p = 0,86$). Outros autores relataram

uma mediana superior de leucócitos de 235,00 células/mm³ em pacientes imunocompetentes com encefalites por herpesvírus (CHESKY *et al.*, 2000).

As quatro amostras com coinfeções por dois herpesvírus apresentaram uma mediana significativamente maior de monócitos do que as demais amostras de LCR positivas ($p = 0,03$). O número de leucócitos também foi maior nos pacientes coinfectados do que nos pacientes sem coinfeção, embora essa diferença não seja significativa ($p = 0,80$). Weinberg *et al.* (2005) observaram uma média maior de leucócitos no LCR de pacientes com coinfeções de outros vírus juntamente com EBV do que em pacientes sem coinfeções virais com EBV detectado no LCR, embora essa diferença não seja relevante. Esses autores sugerem que coinfeções com múltiplos vírus estejam associadas com o aumento da resposta inflamatória local (WEINBERG *et al.*, 2005).

Um número significativamente maior de pacientes imunocomprometidos apresentou taxas de glicose abaixo do normal (40,00%; 8/20) com relação aos imunocompetentes, em que apenas um paciente apresentou glicose baixa no LCR ($p = 0,02$). Níveis baixos de glicose em pacientes imunossuprimidos com infecções por herpesvírus no SNC já foram citados por outros autores (ARRIBAS *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2010). Outros pesquisadores relatam todos os pacientes imunocompetentes com valores normais de glicose (CHESKY *et al.*, 2000). A mediana de glicose foi similar para todos os vírus estudados, sem diferença significativa entre eles ($p = 0,65$), corroborando com os valores achados de outros autores (CONNELLY; DEWITT, 1994).

A mediana de proteínas totais foi elevada em pacientes diagnosticados com HSV, EBV e CMV. Chesky *et al.* (2000) encontraram mediana de proteínas elevada em pacientes imunocompetentes com HSV detectado no LCR. Rojanawiwat *et al.* (2005) também encontraram quantidades de proteínas elevadas em pacientes com EBV detectado no LCR. Arribas *et al.* (1996) encontraram mediana de níveis de proteína de 79,00 mg/dL em pacientes imunocompetentes com encefalites por CMV. Gozlan *et al.* (1995) relataram pacientes imunossuprimidos com DNA de CMV detectado no LCR com uma média de proteínas no LCR de 150,00 mg/dL.

Nos LCRs dos pacientes imunocomprometidos, a mediana de proteínas totais foi significativamente maior do que nos pacientes imunocompetentes (128,00 mg/dL e 53,50 mg/dL, respectivamente; $p = 0,05$). Hanson *et al.* (2007) encontraram

concentração de proteínas elevadas em todas as amostras de LCR de pacientes com encefalites por HSV, independentemente do *status* imunológico do paciente.

A mediana de proteínas totais apresentou tendência de ser maior em pacientes com meningoencefalite (104,45 mg/dL) do que em pacientes com encefalite (62,15 mg/dL; $p = 0,08$). No estudo de Simko *et al.* (2002), a concentração de proteínas também foi menor em pacientes com encefalite por HSV (média de 73,00 mg/dl) do que em pacientes com meningites por HSV (média de 129,00 mg/dl; $p = 0,001$), especialmente nos casos em que números mínimos de eritrócitos também estavam presentes.

Neste estudo, apresentaram valores normais de proteínas totais 27% (6/22) dos pacientes com encefalites e 12,50% (2/16) dos pacientes com meningoencefalites ($p = 0,42$). Avkan *et al.* (2006) relataram dois casos de encefalite por HSV em pacientes que apresentavam achados bioquímicos e celulares normais no LCR. Nesses pacientes, o diagnóstico foi feito por ressonância magnética e PCR. No estudo de Simko *et al.* (2002), quatro pacientes com encefalite por HSV (25%) tinham concentrações de proteínas normais. Porém, Tang *et al.* (1999b) não encontraram contagens de leucócitos normais ($< 5,00$ células/mm³) e níveis de proteína normais ($< 45,00$ mg/dl) em nenhuma das 24 amostras de LCR em que foi encontrado DNA de HSV.

Não houve diferença no número de hemácias encontrado nos pacientes com encefalites e meningoencefalites. Simko *et al.* (2002) não encontraram diferença significativa no número de hemácias no LCR de pacientes diagnosticados com encefalites e meningites, apesar de vários pacientes apresentarem valores de hemáceas bastante elevados ($> 5000,00$ células/mm³).

Quando comparado entre os grupos de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos, o ácido láctico apresentou um valor significativamente maior no grupo dos pacientes imunocomprometidos ($p = 0,002$), embora os valores tenham sido baixos nos dois grupos de pacientes. Ácido láctico acima do normal ($> 3,5$ mmol/L) foi encontrado em 33% (4/20) dos pacientes imunocomprometidos e em nenhum paciente imunocompetente, com uma diferença significativa ($p = 0,03$).

Ao comparar os pacientes imunocomprometidos HIV positivos, imunocomprometidos HIV negativos e imunocompetentes, o ácido láctico apresentou mediana um pouco acima do normal nos pacientes do grupo II, HIV negativos, com uma diferença significativa dos demais grupos ($p = 0,0005$).

A dosagem do ácido láctico no LCR é considerada clinicamente útil no diagnóstico diferencial de infecções associadas com baixas concentrações de glicose (BROOK, 1981). Os níveis de ácido láctico são inversamente proporcionais aos de glicose no LCR, o que é indicativo de glicólise anaeróbica pelo tecido cerebral ou por células que ultrapassam as leptomeninges (ALMEIDA *et al.*, 2009; FISHMAN, 1992). No presente estudo, a mediana de glicose foi normal no LCR de todos os pacientes, o que justifica um valor de ácido láctico normal.

Davies *et al.* (2005) encontraram uma contagem normal de leucócitos no LCR em 53% das amostras positivas, que incluíam resultados positivos de HHV-6, EBV, HSV-1 e CMV. Proporções semelhantes de amostras com PCR positivo no LCR com contagem de leucócitos normais foram encontradas em ambos os pacientes, imunocomprometidos e imunocompetentes. Além disso, 34% das amostras positivas tinham tanto contagem de leucócitos quanto níveis de proteína normais. Esses autores sugerem que o rendimento diagnóstico das investigações pela PCR deve ser maximizado por meio de ensaios sensíveis para a detecção de patógenos em amostras de LCR coletadas no período apropriado, ao invés de aplicar critérios de seleção com base em parâmetros laboratoriais do LCR.

O número de leucócitos foi maior em pacientes imunossuprimidos HIV positivos (43,7 leucócitos/mm³) do que nos imunossuprimidos HIV negativos e imunocompetentes. A contagem de linfócitos também foi maior em pacientes do grupo II, HIV positivos. A mediana de proteínas totais foi significativamente maior nos pacientes imunossuprimidos HIV positivos. Em estudo com portadores de HIV clinicamente e neurologicamente normais, 32% apresentam aumento de células e 18% tem aumento de proteínas no LCR (MARSHALL *et al.*, 1988; MARSHALL *et al.*, 1991). Spina-França *et al.* (1987) apresentaram análise sistematizada do LCR em cinquenta pacientes com AIDS com sintomas no SNC, e em apenas 10% (5/50) o exame do LCR era normal. Os autores defendem que as alterações inflamatórias do LCR podem ocorrer devido a agentes etiológicos, atuando isoladamente ou em associação com o HIV. No estudo de Livramento, Machado e Spina-França (1989), em apenas 4,70% (8/170) dos pacientes com AIDS e sinais de sintomas sugestivos de comprometimento no SNC o exame do LCR era normal. Foi possível identificar agente etiológico em 52,10% (88/170) dos casos.

Os resultados de proteínas, leucócitos e linfócitos mais elevados em pacientes imunocomprometidos infectados com HIV, nesta pesquisa, sugerem que

uma inflamação e lesão mais pronunciadas ocorram devido à soma das desordens provocadas pelo HIV e também pelos herpesvírus no SNC.

Em suma, os resultados encontrados neste estudo contribuem para a determinação da frequência das neuroinfecções causadas pelos vírus da família *Herpesviridae* na população da cidade de Curitiba. Informações úteis dos parâmetros demográficos, clínicos e liquóricos de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos diagnosticados com meningoencefalites, encefalites e mielite foram obtidas. Um melhor conhecimento sobre as técnicas de biologia molecular diagnóstica possibilita um tratamento mais adequado para os pacientes com infecções agudas no sistema nervoso central.

8 CONCLUSÃO

Neste estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com infecção neurológica por herpesvírus.

A técnica de PCR que apresentou a maior porcentagem de positividade foi a técnica de *nested* PCR.

Os vírus da família *Herpesviridae* foram encontrados em 4,7% das amostras testadas no período estudado, sendo que a faixa etária com maior número de casos foi de 31 a 50 anos, com predomínio no gênero masculino e em pacientes de raça branca. A distribuição dos herpesvírus encontrados foi diferente nos grupos de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos. No grupo dos pacientes imunocompetentes, o vírus mais frequente foi o HHV-6, e no grupo dos pacientes imunocomprometidos o mais frequente foi o EBV.

Não houve correlação entre a frequência de amostras positivas para herpesvírus e índice pluviométrico, temperatura atmosférica e sazonalidade na cidade de Curitiba no período estudado.

Encontrou-se maior frequência de vírus da família *Herpesviridae* e maior mortalidade no grupo em que foi identificado algum fator de imunocomprometimento associado. A causa de imunossupressão mais frequentemente associada à infecção por herpesvírus no SNC foi a infecção por HIV.

Não houve diferença entre as características citológicas e bioquímicas do LCR entre as amostras com diferentes vírus da família *Herpesviridae* identificados, apresentando um padrão de infecção viral em todos os casos.

As amostras de LCR em coinfectados com mais de um vírus da família *Herpesviridae* ou com HIV apresentaram número maior de leucócitos e, nos casos de coinfecção com HIV, apresentaram também maior concentração de proteínas totais.

REFERÊNCIAS

- ABERLE, S. W.; PUCHHAMMER-STÖCKL, E. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 25, p. S79-S85, 2002.
- AHTILUOTO, S. *et al.* In situ hybridization detection of human herpesvirus 6 in brain tissue from fatal encephalitis. **Pediatrics**, Springfield, v. 105, p. 431-433, 2000.
- ALMEIDA, S. M. *et al.* Infecções por enterovírus no SNC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEUROLOGIA, 24., 2010, Academia Brasileira de Neurologia, Rio de Janeiro.
- ALMEIDA, S. M. *et al.* Laboratorial diagnosis of Lymphocytic Meningitis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 5, p. 489-495, 2007.
- ALMEIDA, S. M. *et al.* Quantitation of cerebrospinal fluid lactic acid in infectious and non-infectious neurological diseases. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, Berlin, v. 47, n. 6, p. 755-761, 2009.
- AL-SHEKHLEE, A.; KOCHARIAN, N.; SUAREZ, J. J. Re-evaluating the diagnostic methods in Herpes simplex encephalitis. **Herpes**, Worthing, 2006. v. 13, n. 1, p. 17-19.
- ANAGNOSTOPOULOS, L. *et al.* Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for interindividual infection route of Epstein-Barr virus. **Blood**, New York, v. 85, n. 3, p. 744-750, 1995.
- ANTINORI, A. *et al.* Value of combined approach with thallium-201 single-photon emission computed tomography and epstein-barr virus DNA polymerase chain reaction in CSF for the diagnosis of AIDS-related Primary CNS lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 17, n. 2, p. 554-560, 1999.
- APPLEBAUM, E.; RACHELSON, M. H.; DOLGOPOL, V. B. Varicella encephalitis. **The American journal of medicine**, New York, v. 15, p. 223-230, 1953.
- ARRIBAS, J. R. *et al.* Cytomegalovirus encephalitis. **Annals of internal medicine**, Philadelphia, v. 125, p. 577-587, 1996.
- ASLANZADEH, J. *et al.* A prospective study of the polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid submitted to the clinical virology laboratory. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 6, n. 5, p. 367-373, 1992.
- ATKINS, J. T. *et al.* Polymerase chain reaction to detect cytomegalovirus DNA in the cerebrospinal fluid of neonates with congenital infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 169, p. 1334-1337, 1994.

AURELIUS, E. *et al.* Encephalitis in immunocompetent patients due to Herpes simplex virus type 1 or 2 as determined by type-specific polymerase chain reaction and antibody assays of cerebrospinal fluid. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 39, p. 179-186, 1993.

AURELIUS, E. *et al.* Neurologic morbidity after Herpes simplex virus type 2 meningitis: A retrospective study of 40 patients. **Scandinavian journal of infectious diseases**, Stockholm, v. 34, p. 278-283, 2002.

AURELIUS, E; JOHANSSON, B. Rapid diagnosis of Herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. **Lancet**, London, v. 337, n. 8735, p. 189-193, 1991.

AVKAN, O. V. *et al.* Two cases of herpes encephalitis with normal cerebrospinal fluid findings. **Mikrobiyoloji Bulteni**, Ankara, v. 40, p. 93-98, 2006.

BASKIN, H.; HEDLUND, G. Neuroimaging of herpesvirus infections in children. **Pediatric radiology**, Berlin, v. 37, p. 949-963, 2007.

BASTIAN, F. O. *et al.* Herpesvirus hominis: isolation from human trigeminal ganglion. **Science**, Washington, v. 178, p. 306-307, 1972.

BÉLEC, L. *et al.* Sequences of human herpes virus type 8 and Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system non-Hodgkin's lymphoma. **Archives d'anatomie et de cytologie pathologiques**, Paris, v. 45, p. 159-63, 1997.

BERENBERG, W.; WRIGHT, S.; JANEWAY, C. A. Roseola infantum (exanthem subitum). **New England journal of medicine**, Boston, v. 241, p. 253-259, 1949.

BERGER, J. R.; HOUFF, S. Neurological complications of herpes simplex virus type 2 infection. **Archives of neurology**, Chicago, v. 65, n. 5, p. 596-600, 2008.

BERGSTRÖM, T. Polymerase chain reaction for diagnosis of varicella zoster virus central nervous system infections without skin manifestations. **Scandinavian journal of infectious diseases**, Stockholm, Suppl., v. 100, p. 41-45, 1996.

BHATTI, N. *et al.* Encephalitis due to Epstein-Barr virus. **Journal of Infection**, London, v. 20, p. 69-72, 1990.

BLOOM, D. C. HSV LAT and neuronal survival. **International Reviews of Immunology**, New York, n. 23, p. 187-198, 2004.

BOARETTI, M.; SCALET, G.; FONTANA, R. A two-year prospective study of clinical criteria and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid for the diagnosis of viral infections of the central nervous system. **New Microbiologica**, Pavia, v. 31, p. 445-450, 2008.

BOIVIN, G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. **Herpes**, Worthing, Supplement 2, v. 11, p. 48A-56A, 2004.

BOLOVAN-FRITTS, C. A.; MOCARSKI, E. S.; WIEDEMAN, J. A. Peripheral blood CD14(1) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. **Blood**, New York, v. 93, n. 1, p. 394-398, 1999.

BOPPANA, S. B. *et al.* Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. **Pediatrics**, Springfield, v. 104, p. 55-60, 1999.

BOUGHTON, C. R. Varicella-zoster in Sydney: 11. Neurological complications of varicella. **Medical journal of Australia**, Sydney, v. 2, p. 444-447, 1966.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS – DATASUS. **Meningite**. Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/meningite/bases/meninbr.def>>. Acesso em: 23 nov. 2010.

_____. **Sistema de Informações de Saúde**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. Acesso em: 1 fev. 2007.

BRAY, P. F. *et al.* Demyelinating disease after neurologically complicated primary Epstein-Barr virus infection. **Neurology**, New York, v. 42, p. 278-282, 1992.

BRINK, N. S. *et al.* Detection of Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA in CDF from persons infected with HIV who had neurological disease. **Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, London, v. 65, p. 191-195, 1998.

BROOK, I. The importance of lactic acid in body fluids in the detection of bacterial infections. **Reviews of infectious diseases**, Chicago, v. 3, p. 470-478, 1981.

BROWN, Z. A. *et al.* Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus. **JAMA**, Chicago, v. 289, n. 2, p. 203-209, 2003.

BURNSTINE, R. C.; PAINE, R. S. Residual encephalopathy following roseola infantum. **American journal of diseases of children**, Chicago, v. 98, p. 144-152, 1959.

BUSTOS, D. E.; ATHERTON, S. S. Detection of Herpes simplex virus type 1 in human ciliary ganglia. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 43, n. 7, p. 2244-2249, 2002.

BUTLER, L. M. *et al.* Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) seroprevalence in population-based samples of African children: evidence for at least 2 patterns of KSHV transmission. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 200, n. 3, p. 430-438, 2009.

BYLSMA, S. S. *et al.* The predictive value of cytomegalovirus retinitis for cytomegalovirus encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. **Archives of ophthalmology**, Chicago, v. 113, p. 89-95, 1995.

CALVARIO, A. *et al.* Herpes consensus PCR test: a useful diagnostic approach to screening of viral diseases of the central nervous system. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 25, p. S71-S78, 2002.

CARROL, E. D. *et al.* Clinical and diagnostic findings of an echovirus meningitis outbreak in the north west of England. **Postgraduate medical journal**, London, v. 82, p. 60-64, 2006.

CASAS, I. *et al.* Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 66, p. 39-50, 1997.

CASAS, I. *et al.* New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 53, p. 25-36, 1995.

CASAS, I. *et al.* Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for Enterovirus- and Herpesviruses in a prospective study. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 57, p. 145-151, 1999.

CASERTA, M. T. *et al.* Neuroinvasion and persistence of human herpesvirus 6 in children. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 170, p. 1586-1589, 1994.

CHAN, P. K. S. *et al.* Case report: human herpesvirus 7 associated fatal encephalitis in a peripheral blood stem cell transplant recipient. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 66, p. 493-496, 2002.

CHAN, P. K. S. *et al.* Human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 infections in bone marrow transplant recipients. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 53, p. 295-305, 1997.

CHAN, P. K. S. *et al.* Presence of human herpesviruses 6, 7, and 8 DNA sequences in normal brain tissue. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 59, p. 491-495, 1999.

CHAN, P. K. S. *et al.* Prevalence and distribution of Human herpesvirus 7 in normal brain. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 62, p. 345-348, 2000.

CHAN, P. K. S. *et al.* Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 64, p. 42-46, 2001.

CHAN, P. K. S. *et al.* Survey for the Presence and Distribution of Human Herpesvirus 8 in Healthy Brain. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 7, p. 2772-2773, 2000.

CHANG, Y. *et al.* Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science**, Washington, v. 266, p. 1865-1869, 1994.

CHESKY, M. *et al.* Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 58, n. 3-B, p. 836-842, 2000.

CHIK, K. W. *et al.* Human herpesvirus-6 encephalitis after unrelated umbilical cord blood transplant in children. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 29, p. 991-994, 2002.

CINQUE, P. *et al.* Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. **AIDS**, London, v. 11, p. 1-17, 1997.

CINQUE, P. *et al.* Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. **Lancet**, London, v. 342, p. 398-401, 1993.

CINQUE, P. *et al.* Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. **AIDS**, London, v. 10, p. 951-958, 1996a.

CINQUE, P. *et al.* The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. **Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, London, v. 61, p. 339-345, 1996.

CINQUE, P.; BOSSOLASCO, S.; LUNDKVIST, Å. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 26 p. 1-28, 2003.

COHEN, A. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: Clinical, diagnostic, and epidemiological aspects. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, Boca Raton, v. 42, n. 2, p. 101-153, 2005.

COHEN, J. I.; Epstein-Barr virus infection. **New England journal of medicine**, Boston, v. 343, n. 7, p. 481-492, 2000.

COHEN, J. I.; COREY, G. R. Cytomegalovirusinfection in the normal host. **Medicine (Baltimore)**, Baltimore, v. 64, n. 2, p. 100-114, 1985.

COHRS, R. J. *et al.* Analysis of individual human trigeminal ganglia for latent Herpes simplex virus type 1 and Varicella-zoster virus nucleic acids using real-time PCR. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, n. 24, p. 11464-11471, 2000.

CONNELLY, K. P.; DEWITT, L. D. Neurologic complications of infectious mononucleosis. **Pediatric Neurology**, Chippewa Falls, v. 10, p. 181-184, 1994.

CONNOLLY, A. M. *et al.* Course and Outcome of Acute Cerebellar Ataxia. **Annals of neurology**, Boston, v. 35, p. 673-679, 1994.

CORBOY, J. R.; GARL, P. J.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; Human herpesvirus 8 DNA in CNS lymphomas from patients with and without AIDS. **Neurology**, New York, v. 50, n. 2, p. 335-340, 1998.

CORCORAN, C. *et al.* The predictive value of cerebrospinal fluid Epstein-Barr viral load as a marker of primary central nervous system lymphoma in HIV-infected persons. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, 2008. v. 42, p. 433-436, 2008.

COREY, L. *et al.* Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. **Annals of internal medicine**, Philadelphia, v. 98, n. 6, p. 958-972, 1983.

CUOMO, L. *et al.* Human herpesvirus 6 infection in neoplastic and normal brain tissue. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 63, p. 45-51, 2001.

DALRYMPLE, M. A. *et al.* DNA sequence of the herpes simplex virus type 1 gene whose product is responsible for transcriptional activation of immediate early promoters. **Nucleic Acids Research**, London, v. 13, p. 7865-7879, 1985.

DAMASIO, A. R.; VAN HOESEN, G. W. The limbic system and the localization of herpes simplex encephalitis. **Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, London, v. 48, p. 297-301, 1985.

DAMBAUGH, T. *et al.* U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 7632-7636, 1984.

DAVIE, J. C.; CEBALLOS, R.; LITTLE, S. C. Infectious mononucleosis with fatal neuritis. **Archives of neurology**, Chicago, v. 9, p. 265-272, 1963.

DAVIES, N. W. S. *et al.* Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. **Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, London, v. 76, p. 82-87, 2005.

DAVIS, L. E.; GUERRE, J.; GERSTEIN, W. H. Recurrent herpes simplex virus type 2 meningitis in elderly persons. **Archives of neurology**, Chicago, v. 67, n. 6, p. 759-760, 2010.

DAVISON, A. J.; SCOTT, J. E. DNA sequence of the major capsid protein gene of herpes simplex virus type 1. **Journal of General Virology**, London, v. 67, p. 2279-2286, 1986a.

_____. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. **Journal of General Virology**, London, v. 67, p. 1759-1816, 1986b.

DAVISON, A. J.; WILKIE, N. M. Nucleotide sequences of the joint between the L and S segments of herpes simplex virus types 1 and 2. **Journal of General Virology**, London, v. 55, p. 315-331, 1981.

DAVISON, A. J. *et al.* The order *Herpesvirales*. **Archives of virology**, Wien, v. 154, n. 1, p. 171-177, 2009.

DEAYTON, J. R.; GRIFFITHS, P. D.; When can cytomegalovirus prophylaxis and maintenance therapy be stopped in HIV disease? **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 13, p. 637-641, 2000.

DEBIASI, R. L. *et al.* Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 25, p. S5-S11, 2002.

DEBIASI, R. L.; TYLER, K. L. Polymerase chain reaction in the diagnosis and management of central nervous system infections. **Archives of neurology**, Chicago, v. 56, p. 1215-1219, 1999.

DEMKIN, V. V. *et al.* Detection and species identification of four human herpesviruses using polymerase chain reaction coupled with restriction endonuclease analysis. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 103, p. 121-128, 2002.

DENNETT, C. *et al.* CSF pretreatment and the diagnosis of herpes encephalitis using the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 34, p. 101-104, 1991.

DEWHURST, S. Human herpes virus type 6 and human herpes virus type 7 infections of the central nervous system. **Herpes**, Worthing, Supplement 2, v. 11, p. 105A-111A, 2004.

DOLAN, A. *et al.* Genetic content of wild-type human citomegalovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 85, p. 1301-1312, 2004.

DOLAN, A. *et al.* The genome of Epstein-Barr virus type 2 strain AG876. **Virology**, New York, v. 350, p. 164-170, 2006.

DOLAN, A. *et al.* The genome sequence of Herpes simplex virus type 2. **Journal of Virology**, Washington, p. 2010-2021, 1998.

DOMACHOWSKE, J. B. *et al.* Acute manifestations and neurologic sequelae of Epstein-Barr virus encephalitis in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 15, n. 10, 1996.

DRAGO, L. *et al.* Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 4, n. 55, 2004.

DREW, W. L. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 14, p. 608-615, 1992.

DRUCE, J. *et al.* Utility of a multiplex PCR assay for detecting herpesvirus DNA in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 5, p. 1728-1732, 2002.

DUMAS, A. M. *et al.* Infectivity and molecular weight of varicella-zoster virus DNA. **Journal of General Virology**, London, v. 47, p. 233-235, 1980.

ENGELS, E. A. *et al.* Risk factors for human herpesvirus 8 infection among adults in the United States and evidence for sexual transmission. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 196, n. 2, p. 199-207, 2007.

EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G.; BARR, Y. M. Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. **Lancet**, London, v. 1, p. 702-703, 1964.

FARBER, S.; WOLBACH, S. B. Intranuclear and cytoplasmic inclusions ("protozoan-like bodies") in the salivary glands and other organs of infants. **American Journal of Pathology**, New York, v. 8, n. 2, p. 123-135, 1932.

FELDMAN, S.; HUGHES, W.; DANIEL, C. B. Varicella in children with cancer: seventy-seven cases. **Pediatrics**, Springfield, v. 55, n. 3, p. 388-397, 1975.

FERRANDO, S. J.; FREYBERG, Z. Neuropsychiatric aspects of infectious diseases. **Critical care clinics**, Philadelphia, v. 24, p. 889-919, 2008.

FIALA, M. *et al.* AIDS dementia complex complicated by cytomegalovirus encephalopathy. **Journal of neurology**, Berlin, v. 240, p. 223-231, 1993.

FINGEROTH, J. D. *et al.* Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. Proceedings of the National **Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 4510-4514, 1984.

FISHER, M.; SHENKER, I. R.; NUSSBAUM, M. P. Infectious mononucleosis. **New York State Journal of Medicine**, New York, v. 80, n. 6, p. 929-934, 1980.

FISHMAN, R. A. **Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1992.

FLEMING D. T. *et al.* Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. **New England journal of medicine**, Boston, v. 337, n. 16, p. 1105-1111, 1997.

FOWLER, K. B.; STAGNO, S.; PASS, R. F.; BRITT W. J.; BOLL, T. J.; ALFORD, C. A. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. **New England journal of medicine**, Boston, v. 326, p. 663-667, 1992.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.

FRENKEL, N. *et al.* Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 748-752, 1990.

FU, B. *et al.* Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpes- virus and risk factors in Xinjiang, China. **Journal of medical virology**, New York, v. 81, n. 8, p. 1422-1431, 2009.

FUKUMOTO, S. *et al.* Subarachnoid hemorrhage and granulomatous angiitis of the basilar artery: Demonstration of the Varicella-Zoster-Virus in the basilar artery lesions. **Stroke**, Dallas, v. 17, n. 5, p. 1024-1028, 1986.

GALLANT, J. E. *et al.* Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 166, p. 1223-1227, 1992.

GILDEN, D. H. Varicella Zoster virus and central nervous system syndromes. **Herpes**, Worthing, Supplement 2, v. 11, p. 89A-94A, 2004.

GILDEN, D. H. *et al.* Herpesvirus infections of the nervous system. **Nature Clinical Practice Neurology**, London, v. 3, n. 2, p. 82-93, 2007.

GILDEN, D. H. *et al.* Medical progress: Neurologic complications of the reactivation of Varicella-Zoster virus. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 342, n. 9, p. 635-645, 2000.

GILDEN, D. H. *et al.* The value of cerebrospinal fluid antiviral antibody in the diagnosis of neurologic disease produced by varicella zoster virus. **Journal of The Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 159, p. 140-144, 1998.

GILDEN, D. H. *et al.* Varicella-zoster virus myelitis: an expanding spectrum. **Neurology**, New York, v. 44, p. 1818-1823, 1994.

GILDEN, D. H.; COHRS, R. J.; MAHALINGAM, R. VZV vasculopathy and postherpetic neuralgia . Progress and perspective on antiviral therapy. **Neurology**, New York, v. 64, p. 21-25, 2005.

GILDEN, D. H.; RANDALL, J. C.; MAHALINGAM, R. VZV vasculopathy and postherpetic neuralgia. Progress and perspective on antiviral therapy. **Neurology**, New York, v. 65, p. 21-25, 2005.

GOMEZ-BROUCHET, A. *et al.* Immunohistochemical assessment of human herpesvirus 8 infection in primary central nervous system large B cell lymphomas. **Journal of clinical pathology**, London, v. 54, p. 617-618, 2001.

GOMEZ, E. *et al.* Herpes simplex virus encephalitis in a renal transplant patient: diagnosis by polymerase chain reaction detection of HSV DNA. **American journal of kidney diseases**, New York, v. 30 n. 3, p. 423-427, 1997.

GOMPELS, U. A. *et al.* The DNA sequence of human herpesvirus-6: Structure, coding content, and genome evolution. **Virology**, New York, v. 209, p. 29-51, 1995.

GONZALES, M. F.; DAVIS, R. L. Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, Oxford, v. 14, p. 345-363, 1988.

GOZLAN, J. *et al.* A prospective evaluation of clinical criteria and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid for the diagnosis of cytomegalovirus-related neurological diseases during AIDS. **AIDS**, London, v. 9, p. 253-260, 1995.

GOZLAN, J. *et al.* Rapid Detection of Cytomegalovirus DNA in Cerebrospinal Fluid of AIDS Patients with Neurologic Disorders. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 166, p. 1416-21, 1992.

GNANN, J. W. Varicella-zoster virus: Atypical presentations and unusual complications. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 186, p. S91-98, 2002.

GRAY, F. *et al.* Varicella-zoster virus infection of the central nervous system in the acquired immune deficiency syndrome. **Brain**, London, v. 117, p. 987-999, 1994.

GREENSPAN, J. S. *et al.* Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. The **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 313, n. 25, p. 1564-1570, 1985.

GRIFFIN, B. D.; VERWEIJ, M. C.; WIERTZ, E. J. H. J. Herpesviruses and immunity: the art of evasion. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, n. 143, p. 89-100, 2010.

GRIFFITHS, P. Cytomegalovirus infection of the central nervous system. **Herpes**, Worthing, Supplement 2, v. 11, p. 95A-104A, 2004.

GROSE, C.; HENLE, W.; HENLE, G.; FEORINI, P. M. Primary Epstein-Barr-virus infections in acute neurologic diseases. **New England journal of medicine**, Boston, v. 292, p. 392-295, 1975.

HAANPAA, M. *et al.* CSF and MRI findings in patients with acute herpes zoster. **Neurology**, New York, v. 51, p. 1405-1411, 1998.

HANSON, K. E. *et al.* Validation of laboratory screening criteria for herpes simplex virus testing of cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 721-724, 2007.

HE, J. *et al.* Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, p. 1296-1300, 1996.

HENLE, G.; HENLE, W.; DIEHL, V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 59, p. 94-101, 1968.

HEPPLESTON, J. D.; PEARCE, K. M.; YATES, P. O. Varicella encephalitis. Archives of disease in childhood, **London**, v. 34, p. 318-321, 1959.

HILL, R. B.; ROWLANDS, D. T.; RIFKIND, D. Infectious pulmonary disease in patients receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 271, p. 1021-1027, 1964.

HJALMARSSON, A.; BLOMQVIST, P.; SKÖLDENBERG, B. Herpes simplex encephalitis in Sweden, 1990-2001: Incidence, morbidity, and mortality. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 45, p. 875-880, 2007.

HOLLAND, N. R. *et al.* Cytomegalovirus encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), **Neurology**, New York, v. 44, p. 507-514, 1994.

HONESS, R. W.; ROIZMAN, B. Regulation of Herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 14, n. 1, 1974.

HUTFIELD, D. C. History of herpes genitalis. **The British journal of venereal diseases**, London, v. 42, n. 4 p. 263, 1966.

IRANI, D. N.; Aseptic meningitis and viral myelitis. **Neurologic Clinics**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 635-viii, 2008.

ITO, M. *et al.* Human herpesvirus 6-meningoencephalitis in an HIV patient with progressive multifocal leukoencephalopathy. **Acta neuropathologica**, Berlin, v. 100, p. 337-341, 2000.

JEFFERY, K. *et al.* Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR results. **Lancet**, London, v. 249, p. 313-317, 1997.

JENSON, H. *et al.* Natural history of primary Epstein-Barr virus infection in children of mothers infected with human immunodeficiency virus type 1. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 179, p. 1395-1404, 1999.

JOHNSON, G. *et al.* Comprehensive PCR-Based Assay for Detection and Species Identification of Human Herpesviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 9, p. 3274-3279, 2000.

JOHNSON, R. T.; OLSON, L. C.; BUESCHER, E. L. Herpes simplex virus infections of the nervous system. **Archives of neurology**, Chicago, v. 18, p. 260-263, 1968.

JONES, J. F. *et al.* T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. **New England journal of medicine**, Boston, 1988. v. 318, p. 733-741.

JUEL-JENSEN, B. E. Infectious mononucleosis: Epstein-Barr virus disease. In: WEATHERALL, D. J.; LEDINGHAM, J. G. G.; WARRELL, D. A. **Oxford textbook of medicine**, Oxford, p. 572-575, 1987.

JUNKER, A. K. Epstein-Barr virus. **Pediatrics in Review**, Elk Grove Village, v. 26, n. 3, p. 79-85, 2005.

KAJI, M.; SHOJI, H. Detection of Epstein-Barr virus genome in peripheral leucocytes and CSF by the polymerase chain reaction in two patients with Epstein-Barr virus related to aseptic meningitis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, London, v. 59, p. 99-104, 1995.

KAPUR, N. *et al.* Herpes simplex encephalitis: long term magnetic resonance imaging and neuropsychological profile. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, London, v. 57, p. 1334-1342, 1994.

KARATAS, H. *et al.* Investigation of HSV-1, HSV-2, CMV, HHV-6 e HHV-8 DNA by real-time PCR in surgical resection materials of epilepsy patients with mesial temporal lobe sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 264, p. 151-156, 2008.

KEENEY, R. E.; KIRK, R. E.; BRIGDEN, D. Acyclovir tolerance in humans. **American Journal of Medicine**, New York, v. 72, p. 176-81, 1982.

KEMPF, W. *et al.* Persistence of human herpesvirus 7 in normal tissues detected by expression of a structural antigen. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 178, p. 841-845, 1998.

KENNARD, C.; SWASH, M. Acute viral encephalitis. Its diagnosis and outcome. **Brain**, London, v. 104, p. 129-148, 1981.

KENNEDY, P. G. E.; Viral encephalitis. **Journal of neurology**, Berlin, v. 252, p. 268-272, 2005.

KIEFF, E. *et al.* Genetic Relatedness of type 1 and type 2 Herpes simplex viruses. **Journal of Virology**, Washington, p. 738-745, 1972.

KIMBERLIN, D. W. Management of HSV encephalitis in adults and neonates: Diagnosis, prognosis and treatment. **Herpes**, Worthing, v. 14, n. 1, p. 11-16, 2007.

KIMBERLIN, D. W.; WHITLEY, R. J. Human herpesvirus-6: neurologic implications of a newly-described viral pathogen. **Journal of Neurovirology**, Houndmills, v. 4, p. 474-485, 1998.

KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; AMLIE-LEFOND, C.; GILDEN, D. H. The patterns of varicella zoster virus encephalitis. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 27, n. 9, p. 927-938, 1996.

KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; DEBIASI, R. L.; TYLER, K. L. Polymerase chain reaction as a diagnostic adjunct in herpesvirus infections of the nervous system. **Brain Pathology**, Zurich, v. 11, p. 452-464, 2001.

KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K. *et al.* Profound cerebrospinal fluid pleocytosis and Froin's Syndrome secondary to widespread necrotizing vasculitis in an HIV-

positive patient with varicella zoster virus encephalomyelitis. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 159, p. 213-218, 1998.

KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K. ; GILDEN, D. H. The expanding spectrum of herpesvirus infections of the nervous system. **Brain Pathology**, Zurich, v. 11, p. 440-451. 2001a.

_____. Varicella-Zoster virus infections of the nervous system: Clinical and pathologic correlates. **Archives of pathology and laboratory medicine**, Chicago, v. 125, p. 770-780, 2001b.

KOMAROFF, A. L.; ABLASHI, D.; JACOBSON, S. Summary of the 6th international conference on HHV-6 and -7. **Herpes**, Worthing, v. 15, n. 2, p. 36-38, 2008.

KOMAROFF, A. L. *et al.* Highlights from 5th international conference on HHV-6 and 7. **Herpes**, Worthing, v. 13, n. 3, p. 81-82, 2006.

KONDO, K. *et al.* Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. **Journal of General Virology**, London, v. 72, p. 1401-1408, 1991.

KOSKINIEMI, M. *et al.* Herpes encephalitis is a disease of middle aged and elderly people: polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus in the CSF of 516 patients with encephalitis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, London, v. 60, p. 174-178, 1996.

KOUZARIDES, T. *et al.* Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. **Journal of virology**, Washington, v. 61, p. 125-133, 1987.

KNOX, C. K.; CARRIGAN, D. R. Active HHV-6 infection in the lymph nodes of HIV-infected patients: in vitro evidence that HHV-6 can break HIV latency. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology**, New York, v. 11, p. 370-378, 1996.

LACROIX, A. *et al.* HHV-6 and EBV DNA quantitation in lymph nodes of 86 patients with hodgkin's lymphoma. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 79, p. 1349 – 1356, 2007.

LAKEMAN, F. D.; WHITLEY, R. J. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: Application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 171, p. 857-63, 1995.

LANDGREN, M. *et al.* Diagnosis of Epstein-Barr Virus-induced Central Nervous System Infections by DNA Amplification from Cerebrospinal Fluid. **Annals of Neurology**, Boston, v. 35, n. 5, p. 631-635, 1994.

LANGE, B. J. *et al.* Encephalitis in infectious mononucleosis: diagnostic considerations. **Paediatrics**, Springfield, v. 58, p. 877-880, 1976.

LASKIN, O. L.; STAHL-BAYLISS, C. M.; MORGELLO, S. Concomitant Herpes Simplex virus type-1 and Cytomegalovirus ventriculoencephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. **Archives of neurology**, Chicago, v. 44, p. 843-847, 1987.

LEVY, J. A. Three new human herpesvíruses (HHV6, 7, and 8). **Lancet**, London, v. 349, p. 558-563, 1997.

LIVORSI, D. *et al.* Brainstem encephalitis: an unusual presentation of herpes simplex virus infection. **Journal of neurology**, Berlin, v. 257, p. 1432-1437, 2010.

LIVRAMENTO, J. A.; MACHADO, L. R.; SPINA-FRANÇA, A. Anormalidades do líquido cefalorraquidiano em 170 casos de AIDS. **Arquivos de neuropsiquiatria**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 326-331, 1989.

LJUNGMAN, P.; HAKKI, M.; BOECKH, M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 24, p. 319-337, 2010.

LUBY, J. P. Varicella-zoster virus. **Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 61, p. 212-222, 1973.

LUDWIG, H. *et al.* The characterization of Varicella-zoster virus DNA. **Journal of General Virology**, London, v. 14, p. 111-114, 1972.

MACMAHON, E. M. *et al.* Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. **Lancet**, London, v. 338, n. 8773, p. 969-973, 1991.

MAHALINGAM, R. *et al.* Latent varicella-zoster viral DNA in human trigeminal and thoracic ganglia. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 323, n. 10, p. 627-631, 1990..

MARSHALL, D. W. *et al.* CSF changes in a longitudinal study of 124 neurologically normal HIV-1 infected US Air Force personnel. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, Hagerstown, v. 4, p. 777-781, 1991.

MARSHALL, D. W. *et al.* Spectrum of cerebrospinal fluid findings in various stages of human immunodeficiency virus infections. **Archives of neurology**, Chicago, v. 45, p. 954-958, 1988.

MASCHKE, M. *et al.* Incidence and prevalence of neurological disorders associated with HIV since the introduction of highly active antiretroviral therapy. **Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, London, v. 69, p. 376-380, 2000.

MCCULLERS, J. A.; LAKEMAN, F. D.; WHITLEY, R. J. Human herpesvírus 6 is associates with focal encephalitis. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 21, p. 571-576, 1995.

MCCUTCHAN, J. A. Cytomegalovirus infections of the nervous system in patients with AIDS. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 20, p. 747-754, 1995.

MCGEACH, D. J.; DAVISON, A. J. DNA sequence of the herpes simplex virus type 1 gene encoding glycoprotein gH, and identification of homologues in the genome of varicella-zoster virus and Epstein-Barr virus. **Nucleic Acids Research**, London, v. 14, p. 111-114, 1986.

MCGEACH, D. J.; DOLAN, A.; FRAME, M. C. DNA sequence of the region in the genome of herpes simplex virus type 1 containing the exonuclease gene and neighbouring genes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 14, p. 3435-3448, 1986.

MCGEACH, D. J. *et al.* Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1. **Nucleic Acids Research**, London, v. 14, p. 1727-1745, 1986.

MCGEACH, D. J. *et al.* Sequence determination and genetic content of the short unique region of the genome of herpes simplex virus type 1. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 181, p. 1-13, 1985.

MCGEACH, D. J. *et al.* The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of Herpes simplex virus type 1. **Journal of general virology**, London, v. 69, p. 1531-1574, 1988.

MEGAH, A. G. *et al.* The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. **Virology**, New York, v. 244, p. 119-132, 1998.

MELANSON, M. *et al.* Varicella-zoster virus DNA in CSF and arteries in delayed contralateral hemiplegia: Evidence for viral invasion of cerebral arteries. **Neurology**, New York, v. 47, p. 569-570, 1996.

MELBYE, M. *et al.* Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. **International journal of cancer**, New York, v. 77, n. 4, p. 543-548, 1998.

MENDOZA, L. P. *et al.* Viral infections of the central nervous system in Brazil, **Journal of infection**, London, v. 54, p. 589-596, 2007.

MERELLI, E. *et al.* Human herpes virus 6 and human herpes virus 8 DNA sequences in brains of multiple sclerosis patients, normal adults and children. **Journal of neurology**, Berlin, v. 244, p. 450-454, 1997.

MILLER-KITTRELL, M.; SPARER, T. E. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. **Virology Journal**, London, n. 6, p. 4, 2009.

MINJOLLE, S. *et al.* Amplification of the six major human herpesviruses from cerebrospinal fluid by a single PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 4, p. 950-953, 1999.

MINJOLLE, S. *et al.* Detection of herpesvirus genomes by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and clinical findings. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 25, p. S59-S70, 2002.

MOLLER, K. L. Exanthema subitum and febrile convulsions. **Acta paediatrica**, Oslo, v. 45, p. 534-540, 1956.

MOMMÉJA-MARIN, H. *et al.* Herpes simplex virus type 2 as a cause of severe meningitis in immunocompromised adults. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 37, p. 1527-1533, 2003.

MONTOYA, J. G. *et al.* Infectious complications among 620 consecutive heart transplant patients at Stanford university medical center. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 33, n. 5, p. 629-640, 2001.

MORGELLO, S. *et al.* Varicella-Zoster Virus Leukoencephalitis and Cerebral Vasculopathy. **Archives of pathology and laboratory medicine**, Chicago, v. 112, p. 173-177, 1988.

MURCHIE, M. J.; MCGEOCH, D. J. DNA sequence analysis of an immediate-early gene region of the herpes simplex virus type 1 genome (map coordinates 0-950 to 0.978). **Journal of General Virology**, London, v. 62, p. 1-15, 1982.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MUSTAFA, M. B.; ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Varicella zoster virus: review of its management. **Journal of oral pathology and medicine**, Copenhagen, v. 38, p. 673-688, 2009.

NICHOLAS, J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus 7. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5975-5989, 1996.

NOWAK, D. A.; BOEHMER, R.; FUCHS, H-H. A retrospective clinical, laboratory and outcome analysis in 43 cases of acute aseptic meningitis. **European Journal of Neurology**, Oxford, v. 10, p. 271-280, 2003.

OKUNO, T. *et al.* Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 4, p. 651-653, 1989.

OLIVEIRA, J. F. *et al.* Neurological disease in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral treatment: a Brazilian experience. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasilia, v. 39, p. 146-151, 2006.

OOI, M. H. *et al.* Human enterovirus 71 disease in sarawak, malaysia: a prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 44, p. 646-656, 2007.

OPSAHL, M. L.; KENNEDY, P. G. E. Investigating the presence of human herpesvírus 7 and 8 in multiple sclerosis and normal control brain tissue. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 240, p. 37-44, 2006.

OXMAN, M. N. *et al.* A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. **New England journal of medicine**, Boston, v. 352, p. 2271-2284, 2005.

PACHECO, L. R. *et al.* Insuficiência renal aguda associada ao uso de aciclovir endovenoso. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 51, n. 5, p. 275-278, 2005.

PASKAVITZ, J. F. *et al.* Acute Arcuate Fiber Demyelinating Encephalopathy Following Epstein-Barr Virus Infection. **Annals of Neurology**, Boston, v. 38, n. 1, 1995.

PEDNEAULT, L.; KATZ, B. Z.; MILLER, G. Detection of Epstein-Barr Virus in the Brain by the Polymerase Chain Reaction. **Annals of neurology**, Boston, v. 32, p. 184-192, 1992.

PEJME, J. Infectious mononucleosis. **Acta medica scandinavica**, Stockholm, Suppl., v. 413, p. 1-83, 1964.

PERNG, G. C. *et al.* Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex vírus latency-associated transcript. **Science**, Washington, v. 287, p. 1500-1503, 2000.

PERRY, L. J. *et al.* Characterization of the IE110 gene of herpes simplex virus type 1. **Journal of General Virology**, London, v. 67, p. 2365-2380, 1986.

PETITO, C. K. *et al.* Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): an autopsy review. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, Baltimore, v. 45, p. 635-646, 1986.

PICA, F.; VOLPI, A. Transmission of human herpesvírus 8: an update. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 20, p. 152-156, 2007.

POHL-KOPPE, A. *et al.* Human herpes virus type 7 DNA in the cerebrospinal fluid of children with central nervous system diseases. **European journal of pediatrics**, Heidelberg, v. 160, p. 351-358, 2001.

POSSON, D. D. Exanthem subitum (roseola infantum) complicated by prolonged convulsions and hemiplegia. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 235-236, 1949.

PRESTON, C. M.; MCGEOCH, D. J. Identification and mapping of two polypeptides encoded within the herpes simplex virus type I thymidine kinase gene sequences. **Journal of Virology**, Washington, v. 38, p. 593-605, 1981.

PREBLUD, S. R.; D'ANGELO, L. J. Chickenpox in the United States, 1972-1977. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 140, p. 257-260, 1979.

PUCHHAMMER-STÖCKL, E. *et al.* Detection of Varicella-Zoster virus DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid of patients suffering from neurological complications associated with chicken pox or herpes zoster. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 7, p. 1513-1516, 1991.

PUCHHAMMER-STÖCKL, E. *et al.* Screening for possible failure of Herpes simplex virus PCR in cerebrospinal fluid for the diagnosis of Herpes simplex encephalitis. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 64, p. 531-536, 2001.

QUINN, J. P.; MCGEOCH, D. J. DNA sequence of the region in the genome of herpes simplex virus type 1 containing the genes for DNA polymerase and the major DNA binding protein. **Nucleic Acids Research**, London, v. 13, p. 8143-8163, 1985.

RAFAILIDIS, P. I. *et al.* Antiviral treatment for severe EBV infections in apparently immunocompetent patients. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 49, p. 151-157, 2010.

RAFAILIDIS, P. I. *et al.* Severe cytomegalovirus in apparently immunocompetent patients: a systematic review. **Virology Journal**, London, v. 5, n. 47, March 2008.

RANTALAIHO, T. *et al.* Acute encephalitis from 1967 to 1991. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 184, p. 169-177, 2001.

REULER, J. B.; CHANG, M. K. Herpes zoster: Epidemiology, clinical features, and management. **Southern medical journal**, Birmingham, v. 77, p. 1149-1156, 1984.

REZAEI, S. A. R. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 1781-1804, 2006.

ROIZMAN, B. *et al.* Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. **Intervirology**, Basel, v. 16, p. 201-217, 1981.

ROIZMANN, B. *et al.* The family *Herpesviridae*: an update. **Archives of virology**, Wien, v. 123, n. 4, p. 425-449, 1992.

ROIZMAN, B. Herpesviridae: a brief introduction. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Fundamental virology**. New York: Raven Press, 1991. p. 841-847.

ROJANAWIWAT, A. *et al.* Frequent detection of Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus but not JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from human immunodeficiency virus-infected patients in northern Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 7, p. 3484-3486, 2005.

ROMERO, J. R.; NEWLAND, J. G. Viral meningitis and encephalitis: Traditional and emerging viral agents. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 14, n. 2, p. 72-82, 2003.

ROULLET, E. Opportunistic infections of the central nervous system during HIV-1 infection (emphasis on cytomegalovirus disease). **Journal of Neurology**, Berlin, v. 246, p. 237-243, 1999.

ROWLEY, A. H. *et al.* Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid patients with herpes simplex encephalitis. **The Lancet**, London, v. 335, p. 440-441, 1990.

ROZENBERG, F.; LEBON, P. Amplification and characterization of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid from patients with acute encephalitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 2412-2417, 1991.

SAID, J. W. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus type 8 encephalitis in HIV-positive and -negative individuals. **AIDS**, London, v. 11, p. 1119-1122, 1997.

SANDERS, V. J. *et al.* Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. **Journal of Neurovirology**, Houndmills, v. 2, p. 249-258, 1996.

SANKUNTAW, N. *et al.* Single tube multiplex real-time PCR for the rapid detection of herpesvirus infections of the central nervous system. London, 2011. (em fase de publicação na **Molecular and Cellular Probes**).

SANTOS, R. P. *et al.* Política de antimicrobianos no hospital de clínicas de Porto Alegre - 2010 comissão de controle de infecção hospitalar. **Revista do HCPA & Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 30, n. 1, p. 13-21, 2010.

SCHELD, W. M.; WHITLEY R. J.; MARRA, M. C. **Infections of the Central Nervous System**. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2004.

SCHLEISS, M. R. Persistent and recurring viral infections: the human herpesviruses. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, St. Louis, v. 39, p. 7-23, jan. 2009.

SCHLOSS, L. *et al.* An international external quality assessment of nucleic acid amplification of herpes simplex virus. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 28, p. 175-185, 2003.

SCHNECK, S. A. Neuropathological features of human organ transplantation. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, Baltimore, v. 24, n. 3, p. 415, 1965.

SCHNELL, R. G. *et al.* Infectious mononucleosis: neurologic and EEG findings. **Medicine (Baltimore)**, Baltimore, v. 45, p. 51-63, 1966.

SEWARD, J. F.; WATSON, B. M.; PETERSON, C. L. Varicella disease after introduction of varicella vaccine in the united states, 1995-2000. **JAMA**, Chicago, v. 287, n. 5, p. 606-611, 2002.

SHALABI, M.; WHITLEY, R. J. Recurrent benign lymphocytic meningitis. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 43, n. 9, p. 1194-1197, 2006.

SHIAN, W. J.; CHI, C. S. Epstein-Barr virus encephalitis and encephalomyelitis: MR findings. **Pediatric Radiology**, Berlin, v. 26, p. 690-693, 1996.

SHOPE, T. C. Chickenpox encephalitis and encephalopathy: evidence for differing pathogenesis. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 55, p. 321-327, 1982.

SILVA, C. A. *et al.* Neurologic Cytomegalovirus complications in patients with AIDS: retrospective review of 13 cases and review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 6, p. 305-310, 2010.

SILVERSTEIN, A.; STEINBERG, G.; NATHANSON, M. Nervous system involment in infectious mononucleosis. **Archives of neurology**, Chicago, v. 26, p. 353-358, 1972.

SIMEPAR. Disponível em: <<http://www.simepar.br>>. Acesso em: 1 mar. 2011.

SIMKO, J. P. *et al.* Differences in laboratory findings for cerebrospinal fluid specimens obtained from patients with meningitis or encephalitis due to herpes simplex virus (HSV). **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 35, p. 414-419, 2002.

SIMMONS, A. Clinical manifestations and treatment considerations of Herpes Simplex Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, Supplement 1, v. 186, p. S71-7, 2002.

SINGER, C.; DIGEL, M.; JAHN, G. Cytomegalovirus cell tropism. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 325, p. 63-83, 2008.

SIXBEY, J.; NEDRUD, J. G.; RAAB-TRAUB, N.; HANES, R. A.; PAGANO, J. S. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 310, n. 19, p. 1225-1230, 1984.

SKOLDENBERG, B. Herpes simplex encephalitis. **Scandinavian journal of infectious diseases**, Stockholm, v. 100, p. 8-13, 1996.

SKOLDENBERG, B. *et al.* Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. Randomised multicentre study in consecutive Swedish patients. **Lancet**, London, v. 2, p. 707-711, 1984.

SMITH, M. G.; LANNETTE, E. H.; REAMES, H. R. Isolation of the virus of herpes simplex and the demonstration of intranuclear inclusions in a case of acute encephalitis. **American Journal of Pathology**, New York, v. 17, p. 55-13, 1941.

SMITH, R. W. P.; GRAHAM, S. V.; GRAY, N. K. Regulation of translation initiation by herpesvíruses. **Biochemical society transactions**, London, n. 36, p. 701-707, 2008.

SO, Y. T.; OLNEY, R. K. Acute Lumbosacral Polyradiculopathy in Acquired Immunodeficiency Syndrome: Experience in 23 Patients. **Annals of Neurology**, Boston, v. 35, n. 1, 1994.

SOARES, C. N. *et al.* Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 303, p. 75-79, 2011.

SOLOMON, T.; HART, I. J.; BEECHING, N. J. Viral encephalitis: a clinician's guide. **Practical neurology**, Oxford, v. 7, p. 285-302, 2007.

SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 401-410, 2004.

SPINA-FRANÇA, A. *et al.* Líquido cefalorraqueano na síndrome da imunodeficiência adquirida. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 412-418.

STAGNO, S. *et al.* Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. **JAMA**, Chicago, v. 256, p. 1904-1908, 1986.

STARAS, S. A. S. *et al.* Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 43, n. 9, p. 1143-51.

STEINER, I.; KENNEDY, P. G. E.; PACHNER, A. R. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. **Lancet Neurol**, London, v. 6, p. 1015-1028, 2007.

STUDAHL, M. *et al.* Herpesvírus DNA detection in cerebral spinal fluid: differences in clinical presentation between Alpha-, Beta-, and Gamma-Herpesvíruses. **Scandinavian journal of infectious diseases**, Stockholm, v. 32, p. 237-248, 2000.

SUGA, S. *et al.* Clinical and Virological Analyses of 21 Infants with Exantem Subitus (Roseola Infantum) and Cerebral Nervous System Complications. **Annals of Neurology**, Boston, v. 33, n. 6, 1993.

TAFRESHI, N. K. *et al.* Development of a multiplex nested consensus PCR for detection and identification of major human herpesvíruses in CNS infections. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 32, p. 318-324, 2005.

TANG, Y. W. *et al.* Effective use of polymerase chain reaction for diagnosis of central nervous system infections. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 29, p. 803-806, 1999b.

TANG, Y. W. *et al.* Molecular diagnosis of Herpes simplex virus infections in the central nervous system. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 7, p. 2127-2136, 1999a.

TAYLOR-WIEDEMAN, J. *et al.* Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of general virology**, London, v. 72, p. 2059-2064, 1991.

TENORIO, A. *et al.* Detection and typing of human herpesvírus by multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 44, n. 2-3, p. 261-269, 1993.

TORIGOE, S. *et al.* Human herpesvírus 7 infection associated with central nervous system manifestations. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 129, p. 301-305, 1996.

TSELIS, A. *et al.* Epstein-Barr virus encephalomyelitis diagnosed by polymerase chain reaction: Detection of the genome in the CSF. **Neurology**, New York, v. 48, p. 1351-1355, 1997.

TSUTSUMI, H. *et al.* Sequential development of acute meningoencephalitis and transverse myelitis caused by Epstein-Barr virus during infectious mononucleosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 13, n. 7, p. 665-667, 1994.

TWOMEY, J. A. *et al.* Olfactory mucosa in herpes simplex encephalitis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, London, v. 42, p. 983-987, 1979.

TYLER, K. L. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: Encephalitis and meningitis, including Mollaret's. **Herpes**, Worthing, Supplement 2, v. 11, p. 57A-64A, 2004.

TYLER, K. L. Neurological infections: advances in therapy, outcome, and prediction. **Lancet Neurol**, London, v. 8, n. 1, p. 19-21, 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos**, 2: teses, dissertações, monografias e trabalhos científicos. Curitiba, 2000.

_____. **Normas para apresentação de documentos científicos**, 6: referências. Curitiba, 2000.

_____. **Normas para apresentação de documentos científicos**, 7: citações e notas de rodapé. Curitiba, 2000.

_____. **Normas para apresentação de documentos científicos**, 9: redação e editoração. Curitiba, 2007.

VAN DEN BERG, J. S. P. *et al.* Neuroinvasion by human herpesvírus type 7 in a case of exanthem subitum with severe neurologic manifestations. **Neurology**, New York, v. 52, n. 5, p. 1077-1079, 1999.

VANDEVANter, D. R. *et al.* Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 1666-1671, 1996.

VESTERGAARD, B. F. *et al.* An international external quality assessment of nucleic acid amplification of herpes simplex virus. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 28, p. 175-185, 2003.

VIDAL, J. E. *et al.* Aids-related progressive multifocal leukoencephalopathy: a retrospective study in a referral center in Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, São Paulo, v. 50, p. 209-212, 2008.

VIDAL, L. R. R. *et al.* **Enterovirus and herpesviridae family as etiologic agents of lymphomonocytary meningitis, southern Brazil**. Curitiba, 2011 (submetido à publicação).

VINTERS, H. V.; WANG, R.; WILEY, C. A. Herpesvíruses in chronic encephalitis associated with intractable childhood epilepsy. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 24, p. 871-879, 1993.

VOLPI, A. Epstein-Barr Virus and Human Herpesvírus Type 8 Infections of the Central Nervous System. **Herpes**, Worthing, Supplement 2, v. 11, p. 120A-127A, 2004.

WADSWORTH, S.; JACOB, R. J.; ROIZMAN, B. Anatomy of herpes simplex virus DNA II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. **Journal of Virology**, Washington, v. 15, n. 6, p. 1487-1497.

WAGNER, K. E. The homepage of Dr. Edward K. Wagner. Disponível em: <<http://www.dbc.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.html>>. Acesso em: 10 set. 2008.

WANG, D.; BORTOLUSSI, R. Acute viral infection of the central nervous system in children: an 8-year review. **Canadian Medical Association journal**, Toronto, v. 125, p. 585-589, 1981.

WANG, F. *et al.* Human herpesvírus 6 DNA in cerebrospinal fluid specimens from allogeneic bone marrow transplant patients: Does it have clinical significance? **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 28, p. 562-568, 1999.

WARD, K. N. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesvíruses-6 and -7 infection in the immunocompetent. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 32, p. 183-193, 2005.

WARD, K. N. *et al.* Human herpesvírus-7 infection of the CNS with acute myelitis in an adult bone marrow recipient. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 30, p. 983-985, 2002b.

WARD, K. N. *et al.* Neuroinvasion during delayed primary HHV-7 infection in an immunocompetent adult with encephalitis and flaccid paralysis. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 67, p. 538-541, 2002a.

WEBER, T. *et al.* Clinical implications of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system. **Journal of Neurovirology, Houndmills**, v. 2, p. 175-190, 1996.

WEINBERG, A. *et al.* Dual infections of the central nervous system with Epstein-Barr virus. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 191, p. 234-237, 2005.

WEISS, L. M. *et al.* Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 320, n. 8, p. 502-506, 1989.

WELLER, T. H.; PEARSON, R. Citomegaloviruses: a historical perspective. **Herpes**, Worthing, v. 7, n. 3, p. 66-69, 2000.

WHITE, N. H. *et al.* Prevalence of cytomegalovirus antibody in subjects between the ages of 6 and 22 years. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 159, p. 1013-1017, 1989.

WHITLEY, R. J. Herpes simplex encephalitis: Adolescents and adults. **Antiviral Research**, Amsterdam, n. 71, p. 141-148, 2006.

WHITLEY, R. Neonatal herpes simplex virus infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 17, p. 243-256, 2004.

WHITLEY, R. J. *et al.* Herpes simplex encephalitis. Clinical assessment. **JAMA**, Chicago, v. 247, n. 3, p. 317-320, 1982.

WHITLEY, R. J. *et al.* Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. **New England journal of medicine**, Boston, v. 314, p. 144-149, 1986.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, London, v. 357, p. 1513-1518, 2001.

WILDEMANN, B. *et al.* Diagnosis of cytomegalovirus encephalitis in patients with AIDS by quantitation of cytomegalovirus genomes in cells of cerebrospinal fluid. **Neurology**, New York, v. 50, p. 693-697, 1998.

WOLF, D. G.; SPECTOR, S. A. Diagnosis of human Cytomegalovirus central nervous system disease in AIDS patients by DNA amplification from cerebrospinal fluid. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 166, p. 1412-1414, 1992.

WOLINSKY, S.; ANDERSSON, J.; ROWLEY, A. Detection of a highly conserved region of Herpesviridae DNA by in vitro enzymatic amplification: application to the detection of a new human herpesvirus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **Advances in experimental medicine and biology**, New York, v. 278, p. 219-229, 1990.

YOSHIKAWA, T.; ASANO, Y. Central nervous system complications in humanherpesvirus-6 infection. **Brain & Development**, Tokyo, v. 22, p. 307-314, 2000.

YOSHIKAWA, T. *et al.* Human herpesvirus 7-associated meningitis and optic neuritis in a patient after allogeneic stem cell transplantation. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 70, p. 440-443, 2003.

YOSHIKAWA, T. *et al.* Invasion by human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 of the central nervous system in patients with neurological signs and symptoms. **Archives of disease in childhood**, London, v. 83, p. 170-171, 2000.

ZARAFONETIS, C. J. D. *et al.* Fatal herpes simplex encephalitis in a man. **American Journal of Pathology**, New York, v. 20, n. 3, 1944.

ZENG, Y. *et al.* Serological mass survey for early detection of nasopharyngeal carcinoma in Wuzhou City, China. **International journal of cancer**, New York, v. 29, p. 139-141, 1982.

ZERR, D.M. *et al.* Effect of antivirals on human herpesvirus 6 replication in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 34, p. 309-317, 2002.

ZHANG, Y. *et al.* Productive infection of primary macrophages with human herpesvirus 7. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 21, p. 10511-10514, 2001.

ZHOU, X. *et al.* The progress on genetic analysis of nasopharyngeal carcinoma. **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 57513, p. 1-13, 2007.

ZIEBOLD, C. *et al.* Severe complications of varicella in previously healthy children in Germany: A 1-year survey. **Pediatrics**, Springfield, v. 108, n. 5, p. e79, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE 1	PROTOCOLO DA METODOLOGIA DE PCR SEGUIDA POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA.....	155
APÊNDICE 2	PROTOCOLO DA METODOLOGIA DE <i>NESTED</i> PCR	157
APÊNDICE 3	DADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM RESULTADOS POSITIVOS OBTIDOS DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS	158
APÊNDICE 4	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMPLIFICADAS DURANTE SEQUENCIAMENTO DE AMOSTRA DE HSV-1	178

APÊNDICE 1

PROTOCOLO DA METODOLOGIA DE PCR SEGUIDA POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA

	HOSPITAL DE CLÍNICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SERVIÇO DE ANÁLISES CLÍNICAS
---	---

PROTOCOLO PCR PAN-HERPEVÍRUS HUMANO (J Clin Microbiol, 38(9), 2000)

N	AMOSTRA DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-
1		1		1	
2		2		2	
3		3		3	
4		4		4	
5		5		5	
6		6		6	
7		7		7	
8		8		8	
9		9		9	
10		10		10	
11		11		11	

DNA e RNA extraído em – _____

Método - _____

Técnico - _____

PCR realizado em - _____ Técnico - _____

MIX PARA PCR: DNA Polimerase (Invitrogen)

Reagente	PANHERPES 1: HSV-1, HSV-2, EBV, CMV, HHV-8 DATA:	Reagente	PANHERPES 2: VZV-1, HHV-6A/B, HHV-7 DATA:
H ₂ O	6,15µL X =	H ₂ O	6,15µL X =
10x Buffer	2.5µL X =	10x Buffer	2.5µL X =
MgCl ₂ 50mM	0.75µL X =	MgCl ₂ 50mM	0.75µL X =
1.25 dntp's	8µL X =	1.25 dntp's	8µL X =
DMSO	1.25µL X =	DMSO	1.25µL X =
Primer HSV-P1	1.75µL X =	Primer VZV-P1	1.75µL X =
Primer HSV-P2	1.75µL X =	Primer VZV-P2	1.75µL X =
TAQ polimerase	0,35µL X =	TAQ polimerase	0,35µL X =
Volume final	25µL	Volume final	25µL
Ciclos	1 x 95°C – 12'		1 x 95°C – 10'
	3 x 95°C – 1'		40 x 95°C – 1'
	60°C – 1'		47°C – 1'
	72°C – 1'		72°C – 1'
	37 x 95°C – 1'		2 Hold 72°C – 3'
	55°C – 45"		4°C - ∞
	72°C – 1'		
	2 Hold 72°C – 3'		
	4°C - ∞		

- Analisar em gel de agarose a 1% Brometo de Etidium 1
- Aplicar no gel: 5µL amostra + 4µL H₂O + 1µL Tampão de amostra.
- Peso molecular: 1Kb, Corrida 100V, por 45'
- Produtos Esperados: Panherpes 1: 532 pb. Panherpes 2: 536pb
- Primers diluídos a 10pmol/ul

DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Reagentes	<i>Bam</i> HI	<i>Bst</i> UI
Produto de PCR	5µl	5µl
Buffer 10X	0,75µl	0,75µl
Enzima	0,5µl	0,5µl
H ₂ O	1,25µl	1,25µl
Volume final	7,5µl	7,5µl
Incubar termobloco 1 hora	37°C	60°C
Adicionar 1,5µl tampão de amostra e correr em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etidium, 100V.		

APÊNDICE 2

PROTOCOLO DA METODOLOGIA DE *NESTED* PCR

	HOSPITAL DE CLÍNICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SERVIÇO DE ANÁLISES CLÍNICAS
---	---

PROTOCOLO PARA HERPESVIRUS: CMV, VZV, EBV, HSV E HHV6

N	AMOSTRA DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-	N	POSIÇÃO GEL DATA-
1		1		1	
2		2		2	
3		3		3	
4		4		4	
5		5		5	
6		6		6	
7		7		7	
8		8		8	
9		9		9	
10		10		10	
11		11		11	

DNA e RNA extraído em – _____
 Metodo - _____
 Tecnico - _____

PCR realizado em - _____ Técnico - _____
 PCR Master Mix _____

Reagente	1º. PCR (2,5 µL do DNA) DATA: _____	2º. PCR (0,5µL do DNA) DATA: _____
H ₂ O	12,9µL X _____ = _____	15 µL x _____ = _____
10x Buffer	2.5µL X _____ = _____	2.5µL x _____ = _____
MgCl ₂ 50mM	0.75µL X _____ = _____	0.75µL x _____ = _____
1.25 dntp's	4µL X _____ = _____	4µL x _____ = _____
Primer 1+ OU 2+ (10 pmol/µL)	0.5µL X _____ = _____	0.5µL x _____ = _____
Primer 1- OU 2- (10 pmol/µL)	0.5µL X _____ = _____	0.5µL x _____ = _____
Primer PRV1+	0,5µL x _____ = _____	0,5µL x _____ = _____
Primer PRV1-	0,5µL x _____ = _____	0,5µL x _____ = _____
TAQ polimerase	0,35µL X _____ = _____	0,25µL x _____ = _____
Volume final	25µL	25µL
Ciclos	1 x 94°C – 2' 40 x 94°C – 30" 48°C – 30" 72°C – 2' 2 Hold 72°C – 10' 4°C – ∞	1 x 94°C – 2' 30 x 94°C – 30" 52°C – 30" 72°C – 1' 2 Hold 72°C – 10' 4°C – ∞

- Analisar em gel de agarose a 3% Brometo de Etidium 1
- Aplicar no gel: 5µL amostra + 4µL H₂O + 1µL Tampão de amostra.
- Peso molecular: 10pb, Corrida 100V, por 45'
- Produtos Esperados: PRV: 140 pb, HSV: 120 pb, CMV: 78 pb, VZV: 98pb, EBV: 54 pb, HHV6: 66pb

APÊNDICE 3

DADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM RESULTADOS POSITIVOS OBTIDOS DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS

PACIENTE	HOSPITAL	DATA INTERNAÇÃO	DATA PCR
1	HC	NAO internado	08/08/2012
2	HC	12/02/2008	11/03/2012
3	HC	03/09/2008	05/09/2012
4	HC	25/03/2008	27/03/2012
5	HC	07/10/2008	09/10/2012
6	HC	05/03/2008	11/03/2012
7	HC	07/08/2008	13/08/2012
8	HC	NAO internado	30/07/2012
9	HC	12/08/2008	21/08/2012
10	HC	29/05/2008	14/06/2012
11	HC	30/11/2007	04/12/2011
12	HC	26/07/2008	29/07/2012
13	HC	11/06/2008	17/06/2012
14	HC	17/09/2008	27/09/2012
15	HC	10/06/2008	13/06/2012
16	HC	30/08/2008	04/09/2012
17	HC	03/10/2008	04/10/2012
18	HC	26/09/2008	01/10/2012
19	HC	22/09/2008	26/09/2012
20	HC	06/09/2008	10/09/2012
21	HC	28/04/2008	01/05/2012
22	HC	25/10/2006	26/10/2010
23	HC	25/10/2006	26/10/2010
24	HC	15/12/2006	16/12/2010
25	HC	05/02/2007	06/02/2011
26	HC	26/07/2007	25/09/2011
27	HC	NAO internado	23/09/2012
28	HC	NAO internado	30/09/2012
29	HC	09/01/2006	19/01/2010
30	HC	NAO internado	03/01/2010
31	HC	NAO internado	09/09/2012
32	HC	23/03/2008	27/03/2012
33	HC	02/10/2008	09/10/2012
34	HC	NAO internado	15/03/2012
35	HC	04/09/2008	10/09/2012
36	HPP	NAO informado	27/12/2009
37	HPP	NAO informado	29/12/2009
38	HPP	NAO informado	26/03/2010
39	HC	NAO internado	31/07/2012
40	HC	29/09/2006	30/09/2010
41	HC	29/07/2006	06/08/2010
42	HC	11/01/2006	12/01/2010
43	HC	19/10/2006	26/10/2010
44	HC	25/10/2006	26/10/2010
45	HC	NAO internado	27/10/2010

PACIENTE	Tempo entre início dos sintomas e PCR - dias	VÍRUS
1	NAO informado	EBV
2	28	EBV
3	1	CMV
4	14	CMV
5	60	CMV/HSV
6	25	EBV
7	9	HSV E CM
8	NAO informado	HHV-6
9	67	HHV-6
10	60	CMV
11	10	HSV-1
12	10	CMV
13	20	EBV
14	9	HHV6/CM'
15	9	HHV-6
16	17	HSV
17	4	HSV
18	8	HHV-6
19	15	HSV
20	5	CMV
21	2	EBV
22	1	EV/EBV
23	2	EBV
24	1	HSV
25	1	EBV
26	58	VZV
27	3	HHV-6
28	NAO informado	HHV-6
29	18	HSV
30	NAO informado	HSV
31	3	HHV-6
32	17	EBV
33	45	HHV-6
34	NAO informado	EBV
35	7	EBV
36	NAO informado	HSV
37	NAO informado	HSV
38	NAO informado	HSV
39	22	EBV
40	2	HSV
41	26	VZV
42	15	HSV
43	13	EBV
44	7	EBV
45	1	EV/EBV

PACIENTE	DATA ALTA/ÓBITO	TEMPO INT (DIAS)	IDADE (anos)	IDADE COD
1	NAO internado	NAO internado	17	6
2	12/08/2008	180	42	8
3	12/09/2008	14	11	5
4	28/03/2008	3	38	8
5	25/10/2008	18	35	8
6	18/03/2008	13	35	8
7	29/09/2008	52	51	9
8	NAO internado	NAO internado	44	8
9	15/09/2008	33	23	7
10	18/06/2008	19	53	9
11	15/12/2007	15	77	9
12	15/08/2008	19	8	5
13	06/08/2008	56	30	7
14	27/10/2008	40	45	8
15	18/07/2008	38	0.10	2
16	26/09/2008	26	43	8
17	28/10/2008	25	72	9
18	02/10/2008	6	61	9
19	10/10/2008	18	30	7
20	16/09/2008	10	15	6
21	05/06/2008	37	32	8
22	28/10/2006	3	6	5
23	27/10/2006	2	6	5
24	19/12/2006	4	42	8
25	18/02/2007	12	0,9	2
26	01/10/2007	65	19	7
27	NAO internado	NAO internado	11	6
28	NAO internado	NAO internado	29	7
29	29/01/2006	20	37	8
30	NAO internado	NAO internado	3	4
31	NAO internado	NAO internado	0,11	2
32	11/04/2008	8	20	7
33	14/11/2008	42	48	8
34	NAO internado	NAO internado	35	8
35	10/09/2008	6	7	5
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	NAO internado	NAO internado	43	8
40	25/10/2006	26	11	5
41	05/09/2006	36	39	8
42	26/01/2006	21	29	7
43	23/12/2006	64	36	8
44	27/10/2006	2	41	8
45	NAO internado	NAO internado	19	7

PACIENTE	SEXO	RAÇA	FEBRE	CEFALÉIA
1	F	B	NAO	SIM
2	M	B	SIM	SIM
3	F	B	NAO	SIM
4	M	B	SIM	SIM
5	M	B	SIM	SIM
6	F	B	SIM	SIM
7	M	B	SIM	NAO
8	M	B	NAO	NAO
9	F	B	NAO	SIM
10	M	B	NAO	NAO
11	M	B	SIM	SIM
12	M	B	SIM	SIM
13	F	B	SIM	SIM
14	F	B	SIM	SIM
15	F	B	SIM	NAO
16	F	B	NAO	SIM
17	M	B	SIM	NAO
18	M	B	NAO	SIM
19	M	B	NAO	SIM
20	M	B	NAO	NAO
21	M	B	NAO	NAO
22	F	M	SIM	SIM
23	M	B	SIM	SIM
24	M	B	SIM	SIM
25	M	B	SIM	NAO
26	F	B	SIM	SIM
27	F	NAO informado	NAO	SIM
28	F	NAO informado	NAO informado	NAO informado
29	F	M	SIM	SIM
30	M	NAO informado	NAO informado	NAO informado
31	M	NAO informado	SIM	NAO
32	F	B	NAO	SIM
33	M	B	SIM	NAO
34	M	B	NAO	SIM
35	M	B	SIM	NAO
36	F	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	M	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	M	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	F	B	NAO	SIM
40	F	B	SIM	SIM
41	F	B	NAO	SIM
42	M	B	SIM	SIM
43	M	B	SIM	NAO
44	M	B	SIM	SIM
45	F	B	SIM	SIM

PACIENTE	VOMITOS	CONVULSÕES	RIGIDEZ DE NUCA	KERNING/BRUDZINS
1	SIM	SIM	SIM	NAO
2	NAO	SIM	NAO	SIM
3	NAO	SIM	NAO	NAO
4	NAO	NAO	NAO	NAO
5	SIM	NAO	NAO	NAO
6	SIM	NAO	NAO	NAO
7	SIM	SIM	NAO	NAO
8	NAO	NAO	NAO	NAO
9	SIM	SIM	SIM	SIM
10	NAO	NAO	NAO	NAO
11	NAO	SIM	NAO	NAO
12	SIM	NAO	SIM	NAO
13	SIM	SIM	NAO	NAO
14	SIM	SIM	NAO	NAO
15	SIM	SIM	SIM	NAO
16	SIM	NAO	NAO	NAO
17	NAO	SIM	NAO	NAO
18	NAO	SIM	NAO	NAO
19	NAO	NAO	NAO	NAO
20	NAO	NAO	NAO	NAO
21	SIM	NAO	NAO	NAO
22	SIM	NAO	SIM	NAO
23	SIM	NAO	NAO	NAO
24	SIM	NAO	SIM	SIM
25	SIM	NAO	NAO	NAO
26	SIM	SIM	SIM	NAO
27	SIM	NAO	NAO	NAO
28	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
29	NAO	NAO	NAO	NAO
30	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
31	SIM	NAO	NAO	NAO
32	SIM	NAO	SIM	NAO
33	NAO	NAO	NAO	NAO
34	NAO	SIM	NAO	NAO
35	SIM	SIM	NAO	NAO
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	SIM	NAO	NAO	NAO
40	NAO	SIM	SIM	NAO
41	SIM	NAO	NAO	NAO
42	NAO	NAO	SIM	NAO
43	NAO	NAO	NAO	NAO
44	SIM	NAO	NAO	NAO
45	SIM	NAO	SIM	NAO

PACIENTE	CONFUSÃO	GLASGOW (int)	< Glasgow	FOTOFOBIA
1	SIM	NAO informado	NAO informado	NAO
2	SIM	13	NAO informado	NAO
3	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
4	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
5	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
6	NAO	NAO	NAO informado	SIM
7	SIM	14	3	NAO
8	SIM	NAO informado	NAO informado	NAO
9	SIM	10	NAO informado	NAO
10	SIM	15	NAO informado	NAO
11	SIM	15	12	NAO
12	NAO	15	NAO informado	NAO
13	NAO	15	NAO informado	NAO
14	SIM	15	NAO informado	NAO
15	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
16	SIM	14	NAO informado	NAO
17	SIM	11	3	NAO
18	SIM	15	14	NAO
19	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
20	SIM	NAO informado	NAO informado	NAO
21	SIM	15	NAO informado	NAO
22	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
23	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
24	NAO	15	NAO informado	NAO
25	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
26	SIM	15	3	NAO
27	SIM	14	NAO informado	NAO
28	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
29	SIM	NAO informado	8	NAO
30	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
31	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
32	SIM	14	13	SIM
33	NAO	15	NAO informado	NAO
34	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
35	SIM	NAO informado	8	NAO
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO
40	NAO	15	NAO informado	NAO
41	SIM	14	NAO informado	NAO
42	NAO	15	NAO informado	SIM
43	SIM	12	3	NAO
44	SIM	NAO informado	NAO informado	NAO
45	NAO	NAO informado	NAO informado	NAO

PACIENTE SINAL NEUROLÓGICO FOCAL

1
2 HEMIPARESIA D; LESÃO HIPODENSE E; MIDRIASE À ESQUERDA; HEM
3 REINTERNA POR CRISES CONVULSIVAS TÔNICO-"DÔNICO" GENERA
4 neuralgia e cefaléia occipital, parestesia e leve diminuição da força em MI
5 DÉFICIT VISUAL (HEMIANOPSIA, HOMÔNIMA D). CAMPO VISUAL DIRE
6
7 , astenia, adinamia.
8 AFASIA DE EXPRESSÃO
9 DÉFICIT MOTOR; PROCESSO INFLAMATÓRIO DESMIELIZANTE; NISTA
10 TETRAPLEGIA (2 MESES ANTES DO INTERNAMENTO) COM CONFUS.
11 Disartria, atonia, afasia de expressão, sialorreia
12 sonolento
13 anisocoria, desvio conjugado do olhar p. esq.
14 BAIXO NÍVEL DE CONSCIÊNCIA / OFTALMO: LESÃO EM ESCLERA A ESC
15 ATAXIA AXIAL E PERIFÉRICA; Crises tônico-clônicas generalizadas de cui
16 ALTERAÇÃO DO ESTADO MENTAL; sonolência; NISTAGMO HORIZONTA
17 ASTENIA, HIPOREXIA; hiporreflexia global, PUPILAS MIÓTICAS POU
18 NISTAGMO HORIZONTAL; HIPONATREMIA IMPORTANTE ; POLIDIPSIA.
19 HEMIPARESIA DESPROPORCIONADA À ESQUERDA, redução de tempe
20
21 REDUÇÃO DO NÍVEL DE CONSCIÊNCIA; ASTENIA, afasia de expressão
22 cefaléia fronta de moderada intensidade, neuralgia, ausência de sinais mer
23
24
25 NISTAGMO vertical/ ESTRABISMO CONVERGENTE
26 NISTAGMO ROTACIONAL/ DESVIO DO OLHAR CONJUGADO PARA A D
27 fraquesa em MMII e disartria
28 NAO informado
29 episódio de síncope, sonolência, midríase a D, nistagmo horizontal a D, mc
30 NAO informado
31
32 Astenia
33 PARESIA DE MI D; BAIXA FORÇA MUSCULAR em MID; SENSIBILIDADE
34
35 Sonolência (associada a distúrbios hidroeletrólíticos)
36 NAO informado
37 NAO informado
38 NAO informado
39 anisocoria, défciti visual de início há 20 dias. disfagia
40
41 hemiparesia esquerda e afasia. síncope
42 diminuição da acuidade visual bilateral; dor retrocular , astenia,
43 ataxia de marcha, amnésia para fatos recentes há 2 meses. pupilas anisoc
44
45

PACIENTE OUTROS SINAIS NEUROLÓGICOS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

PARASTESIA EM COURO CABELUDO; 3 semanas antes de internar iniciou perda p

sonolento

EM JULHO DE 2008 ATENDIDO NO PA-HC COM QUADRO SÚBITO DE CONFUSÃO

PERDA VISUAL (COM INÍCIO DOIS MESES ANTES DA INTERNAÇÃO); ATAXIA; C

PACIENTE PORTADOR DE PARACOCCIDIOMICOSE APRESENTANDO SÍNDROM

episódio de perda de consciência NAO responsiva com crise convulsiva, e amnésia ;

LESÃO TUMORADA, VASCULARIZADA EM CONJUNTIVA TEMPORAL E. (TUMOR

PÓS INTERNAMENTO (3 MESES) 02-10-08 RELATA DOIS EPISÓDIOS DE OTITE

Prostação , irritado, inapetente.

*Sonolenta, dor a apalpação de nuca, à flexão cervical, Lasegue + à esqu

NAO informado

NAO informado

*Fontanela Anterior abaulada, anorexia,prostação. Sonolência

4 crises convulsivas generalizadas predominantemente tônicas , com desvio conjug

NAO informado

NAO informado

NAO informado

sonolenta

sonolência, alucinações, delírio

PACIENTE	HIV	Tempo Dx HIV (mês)	CD4 DI Cél/μL	CV DI
1	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
2	SIM	1	128	244.620
3	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
4	SIM	1	81	117.927
5	SIM	2	1	5.999
6	SIM	1	360	140.396
7	SIM	2	38	> 500.000
8	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
9	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
10	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
11	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
12	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
13	SIM	96	37	52.935
14	SIM	204	218	26.925
15	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
16	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
17	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
18	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
19	SIM	24	332	822
20	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
21	SIM	96	106	> 500.000
22	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
23	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
24	SIM	120	270	INDETECTAVEL
25	NAO	NAO se aplica	NAO informado	NAO se aplica
26	NAO	NAO se aplica	NAO informado	NAO se aplica
27	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
28	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
29	SIM	180	18	56.200
30	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
31	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
32	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
33	SIM	12	319	INDETECTAVEL
34	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
35	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
40	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
41	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
42	SIM	1	5	43.100
43	SIM	1	36	173000
44	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica
45	NAO	NAO se aplica	NAO se aplica	NAO se aplica

PACIENTE	TARV	TRANSPLANTE	Tempo Tx (mês)
1	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
2	NAO	NAO	NAO se aplica
3	NAO se aplica	TMO	4
4	NAO	NAO	NAO se aplica
5	SIM	NAO	NAO se aplica
6	NAO	NAO	NAO se aplica
7	SIM	NAO	NAO se aplica
8	NAO se aplica	NAO informado	NAO se aplica
9	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
10	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
11	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
12	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
13	NAO	NAO	NAO se aplica
14	NAO	NAO	NAO se aplica
15	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
16	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
17	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
18	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
19	SIM	NAO	NAO se aplica
20	NAO se aplica	TMO	2
21	NAO	NAO	NAO se aplica
22	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
23	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
24	SIM	NAO	NAO se aplica
25	NAO informado	NAO	NAO se aplica
26	NAO informado	NAO	NAO se aplica
27	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
28	NAO se aplica	NAO informado	NAO se aplica
29	SIM	NAO	NAO se aplica
30	NAO se aplica	NAO informado	NAO se aplica
31	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
32	NAO se aplica	HEPÁTICO CADAVER 2	
33	SIM	NAO	NAO se aplica
34	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
35	NAO se aplica	TMO	9
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
40	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
41	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
42	NAO	NAO	NAO se aplica
43	NAO	NAO	NAO se aplica
44	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica
45	NAO se aplica	NAO	NAO se aplica

PACIENTE	LESÃO CUTÂNEA/GENITAL	CTC
1	NAO informado	NAO
2	CANDIDÍASE ORAL	SIM
3	NAO	SIM
4	NAO	SIM
5	DERMATITE SEBORRÉICA e CANDIDÍASE ORAL	NAO
6	CANDIDÍASE ORAL	NAO
7	CANDIDÍASE ORAL,HERPES ORAL	SIM
8	NAO informado	NAO informado
9	NAO	SIM
10	ERITRODERMIA DORSAL	NAO
11	Herpes labial, PETÉQUIAS EM MMSS, moniliase oral	NAO
12	NAO	SIM
13	Herpes labial e genital	SIM
14	LESÕES ESBRANQUIÇADAS EM LÁBIOS	SIM
15	monilíase períneo	NAO
16	NAO	SIM
17	NAO	NAO
18	ABDÔMEN: PRESENÇA DE PAPULAS ERITEMATOSAS	NAO
19	NAO	NAO
20	NAO	NAO
21	DERMATITE SEBORRÉICA	NAO
22	NAO	NAO
23	PETÉQUIAS EM FACE	SIM
24	NAO	NAO
25	RASH CUTÂNEO DISSEMINADO, moniliase oral	NAO
26	NAO	SIM
27	NAO	NAO
28	NAO informado	NAO informado
29	NAO	SIM
30	NAO informado	NAO informado
31	NAO	NAO
32	NAO	SIM
33	NAO	SIM
34	NAO	NAO informado
35	NAO	SIM
36	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado
39	NAO	NAO
40	HERPES GENITAL	SIM
41	NAO	SIM
42	rash cutaneo medicamentoso E MONILIASE ORAL	NAO
43	crosta hemática maos,	SIM
44	NAO	SIM
45	NAO	NAO

PACIENTE	DIABETES	SISTEMA RESPIRATÓRIO	OUTROS
1	NAO	PNEUMONIA	ANEMIA E GNA
2	NAO		HEPATITE C
3	NAO		
4	NAO		
5	NAO		ulcera esofagica cmv
6	NAO		
7	NAO		
8	NAO informado		
9	NAO		
10	NAO		
11	SIM		
12	NAO		colesteatoma+mastoic
13	NAO		Pancitopenia e PCR C
14	NAO		
15	NAO		
16	NAO		ESCLERODERMIA CI
17	NAO		
18	NAO		HIPOTIROIDISMO
19	NAO		
20	NAO		
21	NAO		PNEUMONIA
22	NAO		
23	NAO		
24	SIM		
25	NAO		
26	NAO		
27	NAO		
28	NAO		
29	NAO	ASMA	
30	NAO informado		
31	NAO		
32	NAO		
33	SIM		SEPSIS
34	NAO		
35	NAO		IRC E DECH-C de fig
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	NAO		ESTENOSE MITRAL -
40	NAO		
41	NAO		
42	NAO		
43	NAO		marcapasso; candidíax
44	NAO		
45	NAO		

PACIENTE	IMUNOSSUPRESSAO	ÓBITO	DATA EX
1	NAO	NAO	06/08/2008
2	SIM	NAO	NAO informado
3	SIM	NAO	04/09/2008
4	SIM	NAO	25/03/2008
5	SIM	NAO	08/10/2008
6	SIM	NAO	10/03/2008
7	SIM	SIM	11/09/2008
8	NAO informado	NAO	29/07/2008
9	NAO	NAO	20/08/2008
10	NAO	NAO	13/06/2008
11	SIM	NAO	01/12/2007
12	NAO informado	NAO	26/07/2008
13	SIM	NAO	16/06/2008
14	SIM	NAO	26/09/2008
15	NAO	NAO	12/06/2008
16	SIM	NAO	03/09/2008
17	NAO	SIM	03/10/2008
18	NAO	NAO	30/09/2008
19	SIM	NAO	25/09/2008
20	SIM	NAO	09/09/2008
21	SIM	NAO	30/04/2008
22	NAO	NAO	25/20/2006
23	NAO	NAO	25/10/2006
24	SIM	NAO	15/12/2006
25	NAO	NAO	04/02/2007
26	NAO	NAO	24/09/2007
27	NAO	NAO	20/09/2008
28	NAO	NAO	27/09/2008
29	SIM	SIM	15/01/2006
30	NAO informado	NAO informado	NAO informado
31	NAO	NAO	08/09/2008
32	SIM	NAO	27/03/2008
33	SIM	SIM	08/10/2008
34	SIM	NAO	14/03/2008
35	SIM	SIM	09/09/2008
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	NAO	NAO	29/07/2008
40	NAO	NAO	29/09/2006
41	NAO	NAO	04/08/2006
42	SIM	NAO	11/01/2006
43	SIM	NAO	25/10/2006
44	NAO	NAO	25/10/2006
45	NAO	NAO	26/10/2006

PACIENTE	LOCAL	HEMÁCEAS	LEUCÓCITOS	NEUTRÓFILOS
1	LOMBAR	168	7,8	3
2	NAO informado	MAT INSUF	MAT INSUF	MAT INSUF
3	LOMBAR	21,2	12,8	0
4	LOMBAR	8,8	46	0
5	LOMBAR	4,7	5,6	2
6	LOMBAR	22,5	43,7	1
7	LOMBAR	0,3	68,8	0
8	LOMBAR	265	0,3	0
9	LOMBAR	2,1	18,8	5
10	LOMBAR	1105	33	2
11	LOMBAR	2240	4,4	0
12	LOMBAR	3	74	87
13	LOMBAR	3	12,6	67
14	LOMBAR	5,3	8,3	1
15	LOMBAR	20	185	1
16	SUBOCCIPITAL	3,8	32,8	10
17	LOMBAR	70,3	10,9	9
18	LOMBAR	1,2	0,6	0
19	LOMBAR	2	215	3
20	LOMBAR	41,2	0,3	0
21	LOMBAR	8	19	0
22	LOMBAR	1,3	304	37
23	LOMBAR	1,9	148	11
24	LOMBAR	5	130	1
25	LOMBAR	24,3	120	0
26	LOMBAR	5520	50	1
27	LOMBAR	8,1	6	10
28	LOMBAR	6,2	0,3	0
29	LOMBAR	380	210	1
30	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
31	LOMBAR	185	32	14
32	LOMBAR	1,9	171	0
33	SUBOCCIPITAL	0	15	0
34	LOMBAR	8,8	9,3	0
35	LOMBAR	6700	12	25
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	LOMBAR	8,1	2,2	0
40	LOMBAR	5	265	0
41	LOMBAR	0,6	11	0
42	LOMBAR	16,2	103,7	24
43	LOMBAR	555	20	0
44	LOMBAR	58	5,9	0
45	LOMBAR	15	100	3

PACIENTE	MONÓCIOS %	LINFÓCITOS %	PLASMÓCITOS %	EOSINÓFILOS %
1	3	92	0	2
2	MAT INSUF	MAT INSUF	MAT INSUF	MAT INSUF
3	4	96	0	0
4	2	98	0	0
5	10	88	0	0
6	2	97	0	0
7	0	100	0	0
8	0	0	0	0
9	2	93	0	0
10	2	96	0	0
11	0	0	0	0
12	0	13	0	0
13	0	31	2	0
14	5	94	0	0
15	26	72	0	0
16	15	74	1	0
17	8	83	0	0
18	0	0	0	0
19	4	91	0	2
20	0	0	0	0
21	0	100	0	0
22	9	54	0	0
23	4	85	0	0
24	0	99	0	0
25	10	90	0	0
26	1	97	0	1
27	5	85	0	0
28	0	0	0	0
29	8	91	0	0
30	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
31	0	86	0	0
32	4	96	0	0
33	2	98	0	0
34	7	93	0	0
35	6	69	0	0
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	0	0	0	0
40	1	99	0	0
41	0	100	0	0
42	0	76	0	0
43	2	94	4	0
44	1	99	0	0
45	3	94	0	0

PACIENTE	PROTEÍNAS	GLICOSE	ÁCIDO LÁTICO	Glicemia
1	48	46	1,3	NAO informado
2	MAT INSUF	MAT INSUF	MAT INSUF	MAT INSUF
3	49	45	NAO informado	70
4	97,9	49	2,5	93
5	112,7	40	NAO informado	93
6	139	45	3,7	87
7	183,4	14	4,5	NAO informado
8	65	73	1,2	120
9	67,2	40	1,1	NAO informado
10	333	50	NAO informado	159
11	117	83	2,8	139
12	61,3	48	2,4	104
13	41,3	24	2,2	NAO informado
14	41,5	56	1,9	98
15	157	43	1,6	NAO informado
16	91	19	4,1	NAO informado
17	81,8	83	1,4	127
18	31	68	1,7	160
19	59	27	2,8	NAO informado
20	38	64	NAO informado	85
21	265,7	32	3,1	NAO informado
22	46	58	2,5	78
23	52	64	2	92
24	176	237	NAO informado	NAO informado
25	85,7	49	1,9	NAO informado
26	55	41	NAO informado	NAO informado
27	17,1	72	1,7	NAO informado
28	31,6	65	1,3	119
29	151,6	121	NAO informado	NAO informado
30	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
31	32,9	49	1	NAO informado
32	215	13	4,1	NAO informado
33	320	67	2,3	207
34	280	56	NAO informado	80
35	63	398	NAO informado	618
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39	21,3	56	NAO informado	NAO informado
40	83	55	NAO informado	82
41	20	66	NAO informado	81
42	149	32	NAO informado	NAO informado
43	415	46	2	90
44	111	59	2	NAO informado
45	68	52	1,6	NAO informado

PACIENTE	GLICEMIA	CULTURA BACTÉRIAS	CULTURA FUNGOS
1			
2			HEMO+ Candida albic
3	87		
4	115	BAAR +	
5			
6	82		
7		HEMO + S. aureus	
8			
9			
10			
11		HEMO + CGP	
12			
13			LÍQUIDO ASCÍTICO +
14		URINA+ ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS I	
15	72		
16	76		LCR + CRIPTOCOCCI
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			28/03/08; 26/03/08; 25
33			
34			
35			
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39			
40			
41			NAO visualizados
42			
43			
44			
45			

PACIENTE	MICOLOGICO DIRETO	VDRL	ANÁLISE HISTOLÓGICA - BIÓPSIAS
1		Não informado	
2		Não reagente	
3		Não informado	
4		Não reagente	
5		Não reagente	BX DO ESÔFAGO + CMV E EBV
6		Não reagente	
7		Não reagente	MO COM DEFICIÊNCIA MATURATIVA
8		Não reagente	
9		Não reagente	
10		Não reagente	
11		Não reagente	
12		Não informado	
13		Não reagente	MICOBACTERIOSE ILEAL
14		Não reagente	
15		Não informado	
16	CRYPTOCOCCUS SP.	Não reagente	
17		Não informado	
18		Não reagente	
19		LCR: 1:2; SG 1:16	
20		Não reagente	
21		Não reagente	
22		Não reagente	
23		Não informado	
24		Não reagente	
25		Não informado	
26		Não reagente	
27		Não informado	
28		Não reagente	
29		Não reagente	
30		Não informado	
31		Não informado	
32		Não reagente	
33		Não reagente	
34		Não reagente	
35		Não reagente	
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39		Não informado	
40		Não informado	
41		Não reagente	
42	LCR negativo	Não reagente	
43		Não informado	
44		Não reagente	
45		Não informado	

PACIENTE	Antigenemia CMV	IMAGEM DATA	DESCRIÇÃO	IMAGEM DATA
1				
2		06.03.12	RM ENCEFÁLICA DEMONSTRANDO LESÃO	
3		13.08.12	ÁREA HIPODENSE FONTO-PARIETAL ALTA	
4		07.03.12	RM c/ PEQUENOS FOCOS NODULARES DE	
5	Reagente	25.10.12	LESÃO OCCIPITAL À ESQUERDA com realç	
6		03.03.12	TAC crânio normal	
7	REAGENTE 9 +	05.08.12	O ESTUDO TOMOGR. 11.09.12	
8				
9		29.08.12	COM LESÕES MENOS EVIDENTES E SEM	
10		14.06.12	ESTUDO TOMOGRÁFICO COMPUTADORIZ	
11		03.12.11	MÚLTIPLOS FOCOS DE SINAIS ANÔMALOS	
12		30.07.12	APARENTE ÁREA DE REALCE PELO MEIO	
13		22.07.12	ESTUDO TOMOGRÁFICO COMPUTADORIZ	
14		30.09.12	PRESENÇA DE MULTIPLAS LESÕES ARREI	
15		2008	ALTERAÇÕES DE SINAIS NOS GÂGLIOS I	
16				
17				
18				
19		30.09.12	LESÃO HIPODENSE NA PROFUNDIDADE D	
20	NAO REAGENTE			
21		06.05.12	O ESTUDO TOMOGRÁFICO COMPUTADOR	
22				
23				
24				
25				
26		01.08.11	EXTENSAS E DISCRETAS ALTERAÇÕES DI	
27				
28				
29		18.01.10	AUSÊNCIA DE LESÕES EXPANSIVAS, CAP	
30				
31				
32				
33		06.11.12	PERSISTE MATERIAL PREDOMINANTEMEN	
34				
35	REAGENTES + 2	?	TAC crânio: atrofia difusa, sem outras alteraç	
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39				
40		20.out	RM encefálica mostra	21.jan
41				
42		12.01.10	TAC - O estudo mostra	17.01.10
43		26.10.10	TAC- redução volumétrica dos hemisférios ce	
44		27.10.10	RM encefálica mostra: aqueduto cerebral am	
45				

PACIENTE	DESCRIÇÃO	DESCRIÇÃO EEG	DESCRIÇÃO EEG	Diagnóstico
1				Encefalite
2				Encefalite
3		DISCRETO ALENTECIMENTO DA ATIVIDADE		Encefalite
4				Meningite
5				Encefalite
6				Meningite
7	LESÕES HIPODENSAS ACHADAS INDICATIVAS DE ALENTECIMENTO			Encefalite
8		DISFUNÇÃO		Encefalite
9		OS ACHADOS ANORMAIS EM EXAME MELHORADO		Encefalite
10				Mielite por CMV
11		OS ACHADOS ANORMAIS SÃO SUGESTIVOS DE		Encefalite
12				Encefalite
13		REALIZADO EM VIGÍLIA, ATIVAÇÃO E SONO		Encefalite
14				Encefalite
15		ELETROENCEFALOGRAFIA EEG DISCRETAMENTE		Meningoencefalite
16		IDENTIFICAÇÃO MODERADA E DIFUSA DA		Meningite
17		ELETROENCEFALOGRAFIA CORRELAÇÃO: OS ACHADOS		Encefalite
18		EEG ATUAL APRESENTA EXAME ANORMAL DE		Encefalite
19				Encefalite
20	normal		normal	Encefalite
21				Encefalite
22				Meningite
23				Meningite
24				Meningite
25		EVIDENCIANDO: ALENTECIMENTO DISCRETO		Meningite
26				Encefalite
27				Encefalite
28				Não informado
29		EEG anormal. Secundário a sofrimento (moderado)		Encefalite
30				Não informado
31				Meningite
32		A PRESENÇA DE ATIVIDADE LENTA PODE		Meningite
33				Meningite
34				Encefalite
35		OS achados anormais deste exame são compatíveis com		Encefalite
36	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
37	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
38	NAO informado	NAO informado	NAO informado	NAO informado
39				Encefalite
40	RNM compatível com encefalite em região fronto temporal D e tálamo D			Encefalite
41				Meningite
42	Ressonância magnética encefálica - Lesão expansiva captante do meio			Meningite
43				Meningite
44				Meningite
45				Meningite

APÊNDICE 4

ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMPLIFICADAS DURANTE SEQUENCIAMENTO DE AMOSTRA DE HSV-1

```

10      20      30      40
50      60      70      80      90      100

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
....|....|....|....|....|
Produto_Foward primer
CTCCCTGAGGGCCGACGCAGTGGCGCACCTGGAGGCGGGCAAGGACTACCTGGAGATCGAGGTGGGGGGGCGACG
GCTGTTCTTCGTCAAGGCTCACGTG
gi|15887049|dbj|AB072389.1|
HuCTCCCTGAGGGCCGACGCAGTGGCGCACCTGGAGGCGGGCAAGGACTACCTGGAGATCGAGGTGGGGGGGCGA
CGGCTGTTCTTCGTCAAGGCTCACGTG
Produto Reverse Primer
CTCCCTGAGGGCCGACGCAGTGGCGCACCTGGAGGCGGGCAAGGACTACCTGGAGATCGAGGTGGGGGGGCGACG
GCTGTTCTTCGTCAAGGCTCACGTG

110      120      130      140
150      160      170      180      190      200

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
....|....|....|....|....|
Produto_Foward primer
CGAGAGAGCCTCCTCAGCATCCTCCTGCGGGACTGGCTCGCCATGCGAAAGCAGATCCGCTCGCGGATTCCCCAG
AGCAGCCCCGAGGAGGCCGTGCTCC
gi|15887049|dbj|AB072389.1|
HuCGAGAGAGCCTCCTCAGCATCCTCCTGCGGGACTGGCTCGCCATGCGAAAGCAGATCCGCTCGCGGATTCCCC
AGAGCAGCCCCGAGGAGGCCGTGCTCC
Produto Reverse
PrimerCGAGAGAGCCTCCTCAGCATCCTCCTGCGGGACTGGCTCGCCATGCGAAAGCAGATCCGCTCGCGGATT
CCCCAGAGCAGCCCCGAGGAGGCCGTGCTCC

210      220      230      240
250      260      270      280      290      300

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
....|....|....|....|....|
Produto_Foward primer
TGGACAAGCAGCAGGCCGCCATCAAGGTCGTGTGTAACCTCGGTGTACGGGTTCACGGGAGTGCAGCACGGACTCC
TGCCGTGCCGTGCACGTTGCCGCGAC
gi|15887049|dbj|AB072389.1|
HuTGGACAAGCAGCAGGCCGCCATCAAGGTCGTGTGTAACCTCGGTGTACGGGTTCACGGGAGTGCAGCACGGACT
CCTGCCGTGCCGTGCACGTTGCCGCGAC
Produto Reverse
PrimerTGGACAAGCAGCAGGCCGCCATCAAGGTCGTGTGTAACCTCGGTGTACGGGTTCACGGGAGTGCAGCACG
GACTCCTGCCGTGCCGTGCACGTTGCCGCGAC

310      320      330      340
350      360      370      380      390      400

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

```

```

....|....|....|....|....|
Produto_Foward primer
GGTGACGACCATCGGCCGCGAGATGCTGCTCGCGACCCGCGAGTACGTCCACGCGCGCTGGGCGGCCTTCGAACA
ACTCCTGGCCGATTTCCCGAGGCG
gi|15887049|dbj|AB072389.1|
HuGGTGACGACCATCGGCCGCGAGATGCTGCTCGCGACCCGCGAGTACGTCCACGCGCGCTGGGCGGCCTTCGAA
CAGCTCCTGGCCGATTTCCCGAGGCG
Produto Reverse
PrimerGGTGACGACCATCGGCCGCGAGATGCTGCTCGCGACCCGCGAGTACGTCCACGCGCGCTGGGCGGCCTT
CGAACAACTCCTGGCCGATTTCCCGAGGCG

```

```

Produto_Foward primer      GC
gi|15887049|dbj|AB072389.1| HuGC
Produto Reverse Primer      GC

```


ANEXO**TERMO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
EM SERES HUMANOS DO HC-UFPR**

Curitiba, 07 de junho de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Luine Rosele Renaud Vidal Tsuchiya
Nesta

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA ETIOLOGIA DAS MENINGITES ASSÉPTICAS/VIRAIS NO MUNICÍPIO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA DO ESTADO DO PARANÁ”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 31 de maio de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0048.1.208.000-05
Protocolo CEP: 1038.077/2005-05

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 07 de dezembro de 2005.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Renato', followed by a horizontal line.

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR